

Université de Montréal

Caractérisation de la MAP kinase atypique Erk4 : Activation et fonction physiologique

par

Justine Rousseau

Département de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en biologie moléculaire

Décembre, 2009

©, Justine Rousseau, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Caractérisation de la MAP kinase atypique Erk4: Activation et fonction physiologique

présentée par:

Justine Rousseau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

.....Philippe Roux, Ph.D.....

Président-rapporteur

.....Sylvain Meloche, Ph.D.....

Directeur de recherche

.....Jean-François Côté, Ph.D.....

Membre du jury

.....Mario Chevrete, Ph.D.....

Examineur externe

.....Daniel Lajeunesse, Ph.D.....

Représentant du doyen

RÉSUMÉ

Les MAP kinases sont des enzymes essentielles impliquées dans 7 voies de signalisation distinctes qui permettent à la cellule de répondre de manière adéquate aux stimuli extra-cellulaires. Chez les mammifères, les MAP kinases les mieux caractérisées sont Erk1/2, Jnk, p38 et Erk5. Ces enzymes jouent un rôle important dans l'embryogenèse, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que dans la réponse au stress. Erk4 est un membre atypique de la famille MAP kinase. D'une part, la boucle d'activation de Erk4 possède un motif SEG au lieu du motif TXY, très conservé chez les MAP kinases. D'autre part, Erk4 possède une extension en C-terminal du domaine kinase qui n'est pas présente chez les MAP kinases classiques. Jusqu'à présent aucune fonction n'a été attribuée à Erk4. De plus, la voie de signalisation ainsi que le mode de régulation conduisant à l'activation de Erk4 ne sont pas connus. Le seul substrat de Erk4 identifié jusqu'à maintenant est la MAPKAP kinase MK5. L'impact fonctionnel de cette interaction n'est également pas connu. Afin d'en apprendre davantage sur la MAP kinase atypique Erk4, nous avons étudié le mécanisme d'activation de cette kinase ainsi que sa fonction physiologique par une approche de délétion génique chez la souris.

En ce qui concerne l'activation de Erk4, nous avons montré que la boucle d'activation de Erk4 (S¹⁸⁶EG) est constitutivement phosphorylée *in vivo* et que cette phosphorylation n'est pas modulée par les stimuli classiques des MAP kinases dont le sérum et le sorbitol. Cependant, nous avons observé que la phosphorylation de la S¹⁸⁶ augmente en présence de MK5 et que cette augmentation est indépendante de l'activité kinase de l'une ou l'autre de ces kinases. De plus, nous avons établi que la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk4 est requise pour l'interaction stable entre Erk4 et MK5 ainsi que pour l'activation, et la relocalisation cytoplasmique de MK5. Ainsi, notre étude a permis de révéler que Erk4 est régulée de manière différente des MAP kinases classiques et que la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk4 joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité de MK5. Parallèlement, nos résultats mettent en évidence l'existence d'une "Erk4 kinase", dont le recrutement et/ou l'activation semble être facilité par MK5.

Afin d'identifier la fonction physiologique de Erk4, nous avons généré des souris Erk4-déficientes. L'inactivation génique de Erk4 est viable et les souris ne présentent aucune anomalie apparente. Dans le but d'expliquer l'absence de phénotype, nous avons regardé si l'expression de Erk3, le paralogue de Erk4, pouvait compenser la perte de Erk4. Notre analyse a révélé que l'expression de Erk3 dans les souris Erk4^{-/-} n'augmente pas au cours du développement embryonnaire ou dans les tissus adultes afin de compenser pour la perte de Erk4. Par la suite, nous avons adressé la question de redondance entre Erk4 et Erk3. Dans notre laboratoire, les souris Erk3-déficientes ont également été générées et le phénotype de ces souris a récemment été analysé. Cette étude a révélé que l'inactivation génique de Erk3 entraîne un retard de croissance intra-utérin, un défaut de maturation pulmonaire et la mort néo-natale des souriceaux. Nous avons donc regardé la contribution de Erk4 dans ces phénotypes. L'analyse des souris Erk4^{-/-} a révélé que l'inactivation de Erk4 n'entraîne pas de retard de croissance ou de maturation du poumon. De plus, nous avons montré que l'inactivation additionnelle de Erk4 dans les souris Erk3^{-/-} n'accentue pas le phénotype des souris Erk3-déficientes. Ainsi, notre étude a révélé que contrairement à Erk3, Erk4 n'est pas essentielle au développement murin dans des conditions physiologiques. Parallèlement, nous avons montré que Erk4 et Erk3 possèdent des fonctions non-redondantes *in vivo*.

MOTS CLÉS: MAP Kinase, Erk4, régulation, phosphorylation, MK5, fonction physiologique, souris, délétion génique, redondance, Erk3.

ABSTRACT

MAP kinases are essential enzymes implicated in 7 distinct signaling pathways that allow cells to respond appropriately to extracellular stimuli. In mammals, Erk1/2, Jnk, p38 and Erk5 are the best characterized MAP kinases. These enzymes play important roles in embryogenesis, cell proliferation and differentiation and in response to cellular stresses. Erk4 is an atypical member of the MAP kinase family. First, its activation loop is composed of an SEG motif instead of the well conserved TXY motif found in MAP kinases. Second, Erk4 has a C-terminal extension following the kinase domain that is not present in classical MAP kinases. Despite its identification more than a decade ago, the function of Erk4 remains elusive. Moreover, the signaling pathway as well as the regulatory mechanism leading to Erk4 activation is still uncharacterized. The only identified substrate of Erk4 is the MAPKAP kinase MK5, but the functional relevance of this interaction is still unknown. To gain information about the atypical MAP kinase Erk4, we decided to study the activation mechanism of Erk4 and its physiological function using a gene targeted deletion approach in mice.

Regarding the activation of Erk4, we showed that the activation loop of Erk4 (S¹⁸⁶EG) is constitutively phosphorylated *in vivo* and that this phosphorylation is not modulated by classical MAP kinase stimuli such as serum and sorbitol. However, we observed that phosphorylation of S¹⁸⁶ increases in the presence of MK5 and we showed that this increase is independent of the kinase activity of either kinases. Moreover, we established that phosphorylation of Erk4 activation loop is required for the stable interaction between Erk4 and MK5 as well as for the activation and cytoplasmic relocation of MK5. Thus, our study reveals that Erk4 is differently regulated than classical MAP kinases and that Erk4 activation loop phosphorylation is important for its role in the regulation of MK5 activity. In parallel, our results revealed the existence of an “Erk4 kinase” whose recruitment and/or activation seems to be facilitated by MK5.

To gain information about the physiological function of Erk4 we generated Erk4 deficient mice. Gene-targeted inactivation of Erk4 is viable and these mice present no gross abnormality. To explain the absence of phenotype, we analyzed the expression of Erk3, the paralog of Erk4, to determine if it could compensate for the loss of Erk4. Our analysis

revealed that Erk3 expression in Erk4^{-/-} mice is not up-regulated during embryogenesis nor in adult mice tissues in order to compensate for the loss of Erk4. We next addressed the question of redundancy between Erk4 and Erk3. In our laboratory, Erk3^{-/-} deficient mice were also generated and the phenotype of these mice was recently analyzed. This study revealed that gene inactivation of Erk3 leads to intra-uterine growth retardation, lung maturation defect and neo-natal lethality. We then investigated the contribution of Erk4 in these phenotypes. The analysis of Erk4^{-/-} mice revealed that inactivation of Erk4 did not delay intra-uterine growth nor cause pulmonary maturation defect. Moreover, we showed that additional loss of Erk4 in Erk3^{-/-} mice does not accentuate Erk3-deficient mice phenotype. Thus, this study reveals that, contrary to Erk3, Erk4 is dispensable for mice development under normal condition and that Erk4 and Erk3 have non-redundant functions *in vivo*.

KEYWORDS: MAP Kinase, Erk4, regulation, phosphorylation, MK5, physiological function, mice, gene inactivation, redundancy, Erk3

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABELAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS	xiv
REMERCIEMENTS	xx
 CHAPITRE 1.....	 21
1 Introduction	22
1.1 Les protéines kinases	22
1.1.1 La phosphorylation.....	22
1.1.2 Le kinome	23
1.1.3 Structure du domaine kinase.....	24
1.1.4 Mécanismes d'activation	26
1.2 Les MAP kinases	28
1.2.1 Les MAP kinases classiques	30
1.2.1.1 Erk1/2, Jnk et p38.....	30
1.2.1.1.1 Identification	30
1.2.1.1.2 Identité protéique et structure.....	31
1.2.1.1.3 Profil d'expression.....	32
1.2.1.1.4 Voies de signalisation	32
1.2.1.1.4.1 Activation	32
1.2.1.1.4.2 Module kinase.....	33
1.2.1.1.4.3 Substrats	34
1.2.1.1.4.4 Régulation par les protéines d'échaffaudages	35
1.2.1.1.4.5 Inactivation par les protéines phosphatases.....	35
1.2.1.1.4.6 Fonctions	36
1.2.1.1.4.6.1 Erk1/2	36
1.2.1.1.4.6.1.1 Prolifération cellulaire	36
1.2.1.1.4.6.1.2 Différenciation cellulaire	38

1.2.1.1.4.6.1.3 Fonctions cognitives.....	39
1.2.1.1.4.6.1.4 Développement.....	39
1.2.1.1.4.6.2 Jnk	40
1.2.1.1.4.6.2.1 Prolifération cellulaire	40
1.2.1.1.4.6.2.2 Différenciation cellulaire	40
1.2.1.1.4.6.2.3 Apoptose	41
1.2.1.1.4.6.2.4 Développement.....	41
1.2.1.1.4.6.3 p38.....	41
1.2.1.1.4.6.3.1 Production de cytokines pro-inflammatoires	41
1.2.1.1.4.6.3.2 Contrôle du cycle cellulaire	43
1.2.1.1.4.6.3.3 Développement.....	44
1.2.1.2 Erk5	45
1.2.1.2.1 Identification	45
1.2.1.2.2 Structure et particularités	45
1.2.1.2.3 Profil d'expression.....	45
1.2.1.2.4 La voie de signalisation Erk5	45
1.2.1.2.5 Fonctions.....	46
1.2.1.2.5.1 Prolifération cellulaire.....	46
1.2.1.2.5.2 Développement	46
1.2.2 Les MAP kinases atypiques.....	47
1.2.2.1 Erk7/Erk8.....	47
1.2.2.1.1 Identification	47
1.2.2.1.2 Structure et particularités	47
1.2.2.1.3 La voie de signalisation Erk7/Erk8.....	48
1.2.2.1.4 Fonctions	49
1.2.2.1.4.1 Prolifération cellulaire.....	49
1.2.2.1.4.2 Dégradation du récepteur à l'estrogène ER α	49
1.2.2.1.4.3 Régulation négative de l'activité transcriptionnelle du récepteur aux glucocorticoïdes GR α	49
1.2.2.2 Nlk.....	50
1.2.2.2.1 Identification	50
1.2.2.2.2 Structure et particularités	50
1.2.2.2.3 La voie de signalisation Nlk.....	50

1.2.2.2.4 Fonctions	51
1.2.2.2.4.1 Modulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine	51
1.2.2.2.4.2 Dégradation du proto-oncogène c-Myb	52
1.2.2.2.4.3 Développement	52
1.2.2.3 Erk3/Erk4	53
1.2.2.3.1 Identification	53
1.2.2.3.2 Caractérisation du gène <i>Mapk6</i> et <i>Mapk4</i>	53
1.2.2.3.3 Structure et particularités	55
1.2.2.3.4 Profil d'expression	57
1.2.2.3.5 La voie de signalisation Erk3/Erk4	57
1.2.2.3.6 La MAPKAP kinase MK5/PRAK	58
1.2.2.3.7 Fonctions	60
1.2.2.3.7.1 Prolifération cellulaire	60
1.2.2.3.7.2 Différenciation cellulaire	61
1.2.2.3.7.3 Suppression de tumeurs	62
1.2.2.3.7.4 Sécrétion d'insuline	62
1.2.2.3.7.5 Développement	63
1.3 Objectifs de cette thèse	64
1.3.1 Objectif général	64
1.3.2 Objectifs spécifiques	64
1.3.2.1 Étudier le mécanisme d'activation de Erk4	64
1.3.2.2 Caractériser la fonction physiologique de Erk4	64
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	65
 CHAPITRE 2	 85
2 Caractérisation du mécanisme d'activation de la MAP kinase atypique Erk3	
et Erk4	86
2.1 Mise en situation	86
2.2 Article 1	87
<i>Activation Loop Phosphorylation of the Atypical MAP Kinases ERK3 and ERK4</i>	
<i>is Required for Binding, Activation and Cytoplasmic Relocalization of MK5</i>	
 CHAPITRE 3	 126

3 Caractérisation de la fonction physiologique de la MAP kinase atypique Erk4 ...	127
3.1 Mise en situation.....	127
3.2 Article 2	128
<i>Targeted inactivation of Mapk4 in mice reveals specific non-redundant functions of Erk3/Erk4 subfamily MAP kinases</i>	
CHAPITRE 4.....	149
4 Discussion.....	150
4.1 Caractérisation du mécanisme d'activation de Erk3/4.....	150
4.1.1 La boucle d'activation de Erk3/4 est phosphorylée en <i>trans in vivo</i>	150
4.1.2 La phosphorylation de la boucle d'activation de Erk3/4 n'est pas modulée par les stimuli classiques des MAP kinases.....	151
4.1.3 MK5 augmente indirectement la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk3/4.....	152
4.2 La phosphorylation de la S ¹⁸⁹ /S ¹⁸⁶ de la boucle d'activation de Erk3/4 est requise pour la liaison, l'activation et la relocalisation subcellulaire de MK5	153
4.3 Erk4 et MK5 sont des kinases mutuelles	154
4.4 Caractérisation de la fonction physiologique de Erk4	157
4.4.1 L'inactivation du gène <i>Mapk4</i> murin ne révèle aucun phénotype apparent.....	157
4.4.2 Erk4 et Erk3 exercent des fonctions non-redondante <i>in vivo</i>	158
4.4.3 Erk4 pourrait avoir un rôle à jouer dans les comportements associés aux troubles de l'humeur	161
4.4.4 Les souris Erk4 ^{-/-} : un modèle expérimental d'une grande valeur	164
4.5 L'inactivation de l'activité kinase de Erk3 chez la souris révèle que Erk3 possède des fonctions qui sont indépendantes de son activité kinase.....	166
CONCLUSION.....	168
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	169

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

Table 1. Genotype and sex distribution analysis of the progeny from Erk4 ^{+/-} intercrosses.....	136
Table 2. Histopathological analysis of Erk4 knockout mice	136
Table 3. Genotype analysis of the progeny from Erk4 ^{+/-} ; Erk3 ^{+/-} intercrosses	142

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

FIG. 1. Phosphorylation des protéines.....	22
FIG. 2. Représentation des acides aminés phosphorylés par les protéines kinases eucaryotes.....	23
FIG. 3. Le kinome humain.....	24
FIG. 4. Représentation de la structure tertiaire des kinases.....	25
FIG. 5. Représentation de l'environnement de la boucle d'activation des kinases lorsque phosphorylée.....	26
FIG. 6. Les MAP kinases définissent 7 voies de signalisation distinctes.....	29
FIG. 7. Activation du module kinase.....	34
FIG. 8. Organisation génomique de gène Mapk6 et Mapk4 humain.....	55
FIG. 9. Organisation exonique des régions codantes pour les différents sous-domaines du domaine kinase.....	55
FIG. 10. Structure et identité protéique des MAP kinases atypiques Erk3 et Erk4.....	56
FIG. 11. Activation des MAPKAP kinases par les MAP kinases classiques.....	59

CHAPITRE 2

FIG. 1. ERK3 and ERK4 are phosphorylated <i>in trans</i> on Ser189 and Ser186 <i>in vivo</i>	97
FIG. 2. Common mitogenic or stress stimuli do not modulate activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4.....	99
FIG. 3. Overexpression of MK5 increases the phosphorylation of ERK4 on Ser186.....	102
FIG. 4. Overexpression of MK5 increases the phosphorylation of ERK3 on Ser189.....	103
FIG. 5. Activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is essential for optimal MK5 activation <i>in vitro</i>	104
FIG. 6. Activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is required for their stable interaction with MK5 <i>in vivo</i>	106
FIG. 7. Activation loop phosphorylation allows the formation of active ERK3/ERK4-MK5 complexes <i>in vivo</i>	107
FIG. 8. The cytoplasmic redistribution of ERK3 induced by MK5 depends in part on Ser189 phosphorylation.....	109
FIG. 9. Ser186 phosphorylation of ERK4 is required for efficient cytoplasmic	

relocalisation of MK5	110
FIG. 10. Model of the activation of ERK4/ERK4-MK5 complexes.....	114
SUPPLEMENTARY FIG. 1. ERK3 and ERK4 are phosphorylated on Ser386 <i>in vivo</i> ...	119
SUPPLEMENTARY FIG. 2. ERK4 is phosphorylated mainly on serine residues <i>in vivo</i>	120
SUPPLEMENTARY FIG. 3. Effect of various protein kinase inhibitors on the activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4	122
SUPPLEMENTARY FIG. 4. Unphosphorylated ERK3 is not in a catalytically active conformation	123

CHAPITRE 3

FIG. 1. Generation of Erk4-deficient mice	135
FIG. 2. Erk3 mRNA expression does not compensate for loss of Erk4 during mouse embryogenesis	137
FIG. 3. Erk3 protein expression does not compensate for the loss of Erk4 in adult mouse tissues.....	138
FIG. 4. Loss of Erk4 does not affect intra-uterine growth or lung maturation	139
FIG. 5. Additional loss of Erk4 does not accentuate Erk3 intra-uterine growth restriction phénotype	140
FIG. 6. Additional loss of Erk4 does not aggravate the pulmonary immaturity phenotype of Erk3 mutant mice	141

CHAPITRE 4

FIG. 12. Erk4 est phosphorylée par MK5 <i>in vivo</i> sur des résidus sérines.....	154
FIG. 13. MK5 phosphoryle l'extrémité C-terminale de Erk4.MK5 phosphoryle l'extrémité C-terminale de Erk4.....	155
FIG. 14. L'extrémité C-terminale de Erk4 est phosphorylée sur quatre résidus sérine <i>in</i> <i>vivo</i>	157
FIG. 15. Résultats des tests de comportements de type anxieux chez les souris Erk4 ^{-/-} ...	163
FIG. 16. Les souris Erk4 ^{-/-} présentent une diminution des comportements de type dépressif.	164
FIG. 17. Génération des souris exprimant une forme catalytiquement inactive de Erk3...	167

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

A	Adénosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGC	PKA, PKG, PKC
AP-1	Activating protein-1
ARE	AU-rich element
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASK	Apoptosis signal regulating kinase
ATF-2	Activating transcription factor-2
ATM	Ataxia telangiectasia-mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia Rad-3-related
BMK	Big MAP kinase
CAK	Cyclin-dependent kinase activating kinase
CAMK	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase
CaMKII	Calmodulin-dependent kinase II
CD	Common docking
Cdc14	Cell cycle division 14
Cdk	Cyclin-dependent kinase
cDNA	Complementary DNA
Chk2	Checkpoint kinase
CK	Casein kinase
CMGC	CDK, MAPK, GSK3, CDK-like
CREB	cAMP response element-binding protein
Csk	c-Src tyrosine kinase
CTL	Control
D	Docking
DLK	Dual-leucine zipper kinase

DMBA	Dimethyl-benzanthracene
DNA	Deoxyribonucleic acid
DP	Double positive
DUSP	Dual specificity phosphatase
DYRK	Dual-specificity-tyrosine-phosphorylation-regulated protein kinase
E	Embryonic day
EGF	Epidermal growth factor
Elk-1	ETS (E26 Transformation-specific sequence)-like-1
ER α	Estrogen receptor α
ERGIC	Endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
EST	Express sequence tag
Gadd45	Growth arrest and DNA inducible 45 α protein
G-CSF	Granulocyte-colony-stimulating factor
GDP	Guanosine 5'-diphosphate
GPCR	G-protein-coupled receptor
GR α	Glucocorticoid receptor
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 β	Glycogen synthase kinase β
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosine 5'-Tri-Phosphate
HePTP	Hematopoietic PTP
HMG-14	High-mobility-group protein-14
hnRNP	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A0
HSP27	Heat-shock protein 27
IEG	Immediate early gene
IL	Interleukine

Jnk	c-Jun N-terminal kinase
JIP	Jnk-interacting protein
KD/KA	Kinase dead
KSR	Kinase suppressor of Ras
LPS	Lipopolysaccharide
M	Mitose
MAP	Mitogen-activated protein
MAP2	Microtubule associated protein
MAPK	MAP kinase
MAPKK/MKK	MAP kinase kinase
MAPKKK	MAP kinase kinase kinase
MAPKAP-K	MAP kinase-activated protein kinase
MBP	Myelin basic protein
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MEF2	Myocyte-specific enhancer factor 2
MEKK	MEK kinase
MEK	MAPK or Erk kinase
MK	MAPKAP kinase
MKP	MAP kinase phosphatase
MLK	Mixed lineage kinase
MMS	Methyl-methane-sulfonate
MNK	MAPK-interacting kinase
MSK	Mitogen and stress-activated kinase
NDR1/2	N-terminal degradation region 1/2
NES	Nuclear export sequence
Neurog-1	Neurogenine-1
NGF	Nerve growth factor
NLK	Nemo-like kinase
NLS	Nuclear localisation signal

PABP1	PolyA-binding protein-1
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH kinase
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acétate
PP	Protein serine/threonine phosphatase
PRAK	p38-Regulated/Activated Kinase
PTP	Protein tyrosine phosphatase
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonucleic acid
RSK	p90 Ribosomal S6 Kinase
RTK	Récepteur tyrosine kinase
Sap-1	SRF (Serum Response Element) Accessory Protein-1
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase
SCID	Severe combined immuno-deficient
SGK	Serum and glucocorticoid inducible kinase
siRNA	Small inhibitory RNA
SOS	Son Of Sevenless
SP	Single positive
Src	Sarcoma kinase
SRF	Serum response factor
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STE	Homologue des kinases de levure STE 7, STE 11, STE 20
STEP	Strial enriched phosphatase
T	Thymocyte
TAD	Transactivation domain
TAK	TGF- β -Activated Kinase
TAO-1	Thousand and one-1

TCF/LEF	T-cell factor/Lymphoid enhancer factor
TGF β	Transforming growth factor β
Th	T helper
TK	Tyrosine kinase
TKL	Tyrosine kinase-like
TLC	Thin layer chromatographie
TNFR	Tumor Necrotic Factor Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetate
TRAF	TNFR-Associated Factor
TSC1/2	Tuberous sclerosis complex 1/2
TTP	Tristetraprolin
U	Uridine
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolet
Wnt	Wingless/Integration site factor
WT	Wild-type

« L'absence de preuve n'est pas une preuve d'absences »

Auteurs multiples

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche Sylvain Meloche pour m'avoir fait confiance tout au long de mon doctorat. Merci d'avoir cru en moi, malgré le fait que je t'apportais des résultats négatifs la plupart du temps. Merci aussi de m'avoir procuré un environnement de travail stimulant où toutes les idées étaient les bienvenues.

Je tiens également à remercier Nicolas Cermankian ainsi que Phillipe Roux et Mario Chevette pour avoir suivi toute l'histoire de Erk4 et d'avoir fait partie de mes nombreux comités d'évaluation. Merci de l'intérêt que vous avez porté à mon projet... Je remercie par la même occasion les membres qui se joignent à eux pour évaluer ma thèse. Merci d'avoir accepté de m'accorder un peu de votre temps.

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui ont subi des dommages collatéraux durant mon doctorat... Merci à mon fils Elie et à Jo d'avoir enduré mes nombreux découragements ainsi que les nombreuses heures passées au labo. Merci à ma famille et mes amis de m'avoir soutenue dans cette aventure. Je n'aurais pas pu réussir mon doctorat sans vous tous, et bien sûr les quelques verres de vin que nous avons pris ensemble...

Un gros merci à Philippe Coulombe et Benjamin Turgeon qui ont été mes mentors, à Pierre-Luc Tanguay, Paul Deleris et Marc Saba-El-Leil pour les nombreuses discussions scientifiques, à Sonia Klinger et Kim Lévesque pour leur précieuse aide pour l'article du KO de Erk4, à Christel Boutonnet et Geneviève Rodier pour leur support technique et moral, à Sylvia Lehmann, Catherine Julien et Chistophe Frémin pour les discussions hors champs et à tous les autres pour avoir fait partie de mon quotidien et m'avoir fait passer de si belles années avec vous. Je vais m'ennuyer de cette ambiance franco-québécoise, des fous-rires et de ma source inépuisable de nouveautés musicales.

Finalement, un merci tout particulier à Marianne Desrosiers pour son support à *tous* les niveaux et sans qui les prochaines lignes que vous allez lire seraient parsemées de fautes d'orthographe...

CHAPITRE 1

1 Introduction

1.1 Les protéines kinases

1.1.1 La phosphorylation

La phosphorylation joue un rôle majeur dans la régulation de l'activité enzymatique, la localisation sub-cellulaire, les interactions et les fonctions de plusieurs protéines (55, 116, 209). Cette modification post-traductionnelle est réversible et assurée par les protéines kinases. L'activité enzymatique de cette famille de protéines permet de catalyser le transfert du γ phosphate de l'ATP (adénosine triphosphate) sur le substrat (FIG.1.). Chez les eucaryotes, l'ajout du phosphate se fait principalement sur des résidus sérines, thréonines et tyrosines, plus précisément sur le groupement hydroxyle présent sur la chaîne latérale de ces acides aminés (FIG.2).

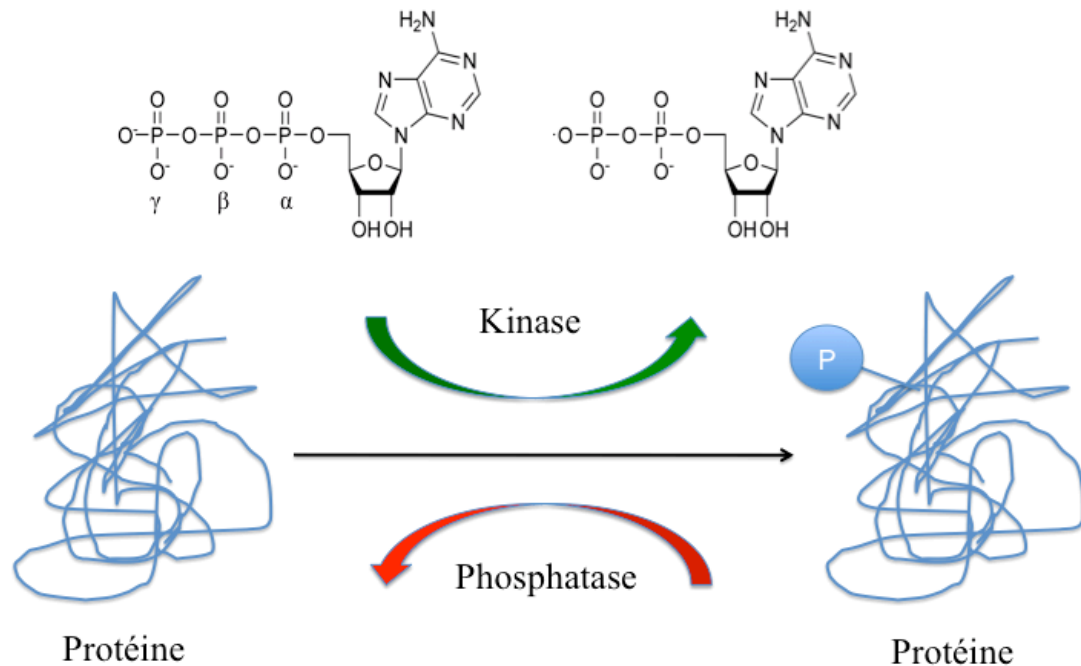


FIG. 1. Phosphorylation des protéines.

La phosphorylation des protéines est une réaction réversible. Le γ phosphate de l'ATP est ajouté sur le substrat par les kinases et retiré par les phosphatases.

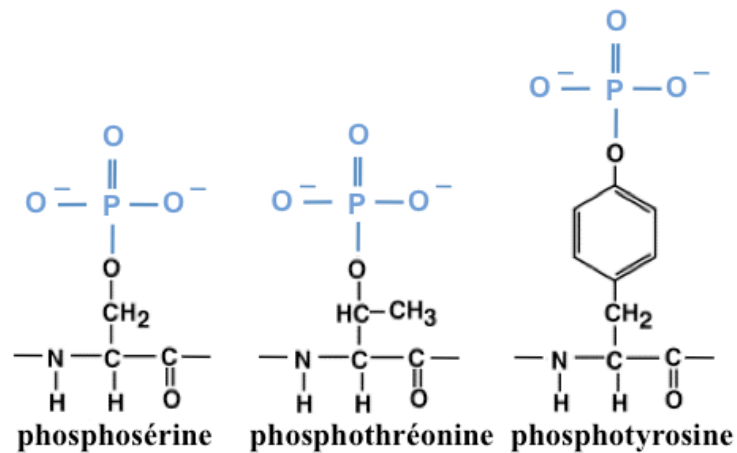


FIG. 2. Représentation des acides aminés phosphorylés par les protéines kinases eucaryotes.

L'ajout du phosphate ce fait sur le groupement hydroxyle des chaînes latérales.

1.1.2 Le kinome

Les protéines kinases composent environ 2% du génome et forment l'une des plus grande famille de protéine chez les eucaryotes (100, 174, 175). Cette famille regroupe à la fois les tyrosines et les sérines/thréonines kinases. Ces dernières représentent environ 80% des membres de cette famille (175).

Le séquençage du génome humain a permis de révéler l'existence de 518 kinases (175). De celles-ci, 40 sont considérées comme des kinases atypiques. Les 478 autres kinases sont regroupées en 7 sous-familles différentes. Leur classification est basée principalement sur la comparaison de la séquence de leur domaine kinase, mais également sur les similitudes des séquences retrouvées à l'extérieur de ce domaine, leurs fonctions biologiques et leur classification chez les organismes inférieurs (71, 100, 174, 175). Les différentes sous-familles sont la famille **TK** (tyrosine kinase), **TKL** (tyrosine kinase-like), **STE** (homologue de la levure STE 7, STE 11, STE 20 kinase), **CK1** (casein kinase 1), **AGC** (PKA, PKG, PKC), **CAMK** (calcium/calmodulin-dependent protein kinase) et **CMGC** (CDK, MAPK, GSK3, CDK-like) (FIG.3.).

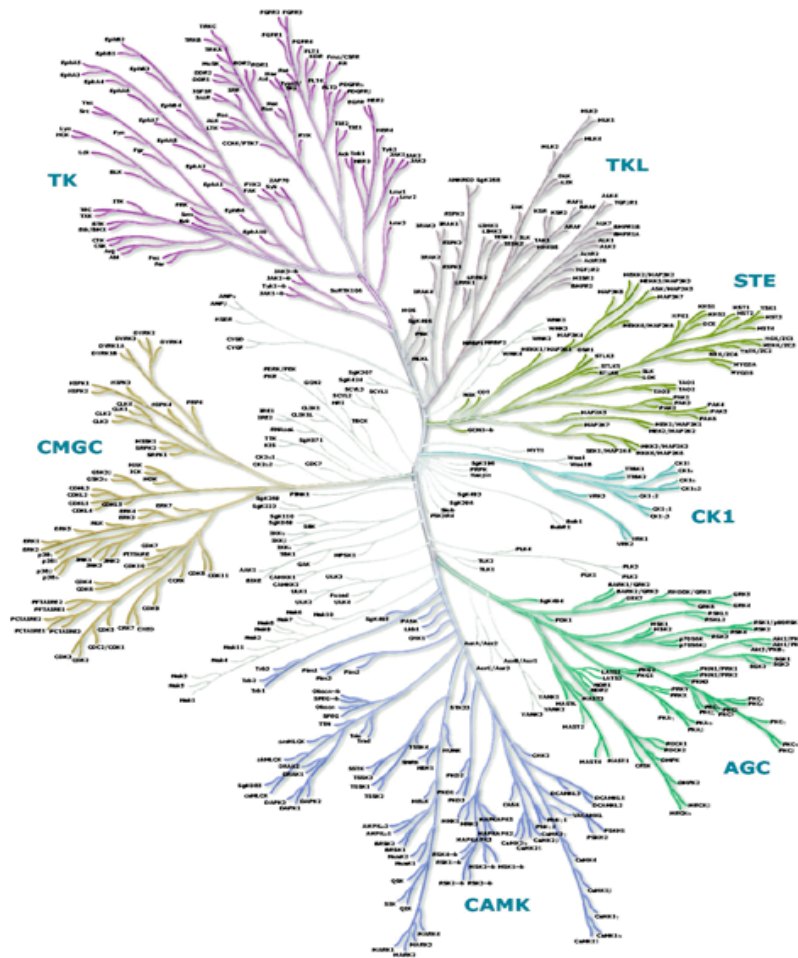


FIG. 3. Le kinome humain.

Les 7 grandes familles sont la famille **TK** (tyrosine kinase), **TKL** (tyrosine kinase-like), **STE** (homologue de la levure STE 7, STE 11, STE 20 kinase), **CK1** (casein kinase 1), **AGC** (PKA, PKG, PKC), **CAMK** (calcium/calmodulin-dependent protein kinase) et **CMGC** (CDK, MAPK, GSK3, CDK-like). Tiré de (175) et adapté par www.cellsignal.com.

1.1.3 Structure du domaine kinase

Toutes les kinases sont composées d'un domaine kinase d'environ 250 à 300 acides aminés, subdivisé en 12 sous-domaines (I-VIa-VIb-XI) (100, 117). À l'intérieur de ces domaines, plusieurs résidus sont conservés et jouent un rôle essentiel pour l'activité kinasique. Afin de situer ces résidus, la séquence de Erk1 (extracellular signal-regulated kinase) sera utilisée comme référence. Ces résidus sont entre autres les résidus glycines **G⁴⁹XG⁵¹XX** (sous-domaine I) et la lysine **K⁷¹** (sous-domaine II) impliqués dans le positionnement de l'ATP, l'acide aspartique **HRD¹⁶⁶LK** (sous domaine VIb) qui agit comme base catalytique pour initier la réaction du transfert du γ phosphate de l'ATP et

l'acide aspartique $D^{184}FG$ (sous domain VII) nécessaire à la liaison des ions Mg^{2+} permettant le positionnement du γ phosphate.

La structure tertiaire du domaine kinase est également bien conservée au sein de cette grande famille (100, 117). Cette structure adopte une conformation bi-lobaire (FIG.4). Le plus petit lobe, le lobe N-terminal (sous domaine 1 à IV) est composé majoritairement de feuillets bêta. Ce lobe est principalement impliqué dans la liaison et le positionnement de l'ATP qui s'intercale dans une cavité à l'interface entre les deux lobes. Le lobe C-terminal (VIB à XI) est quant à lui principalement constitué d'hélices alpha. Il est impliqué dans la reconnaissance du substrat et le positionnement du groupement hydroxyle des résidus sérines, thréonines et tyrosines du substrat. Le lobe C-terminal contient également une petite boucle, appelée la boucle d'activation. Pour la majorité des kinases, la phosphorylation de cette boucle est nécessaire pour leur activation (section 1.1.4). Quant au site catalytique, il est situé à l'interface du lobe N- et C-terminal.

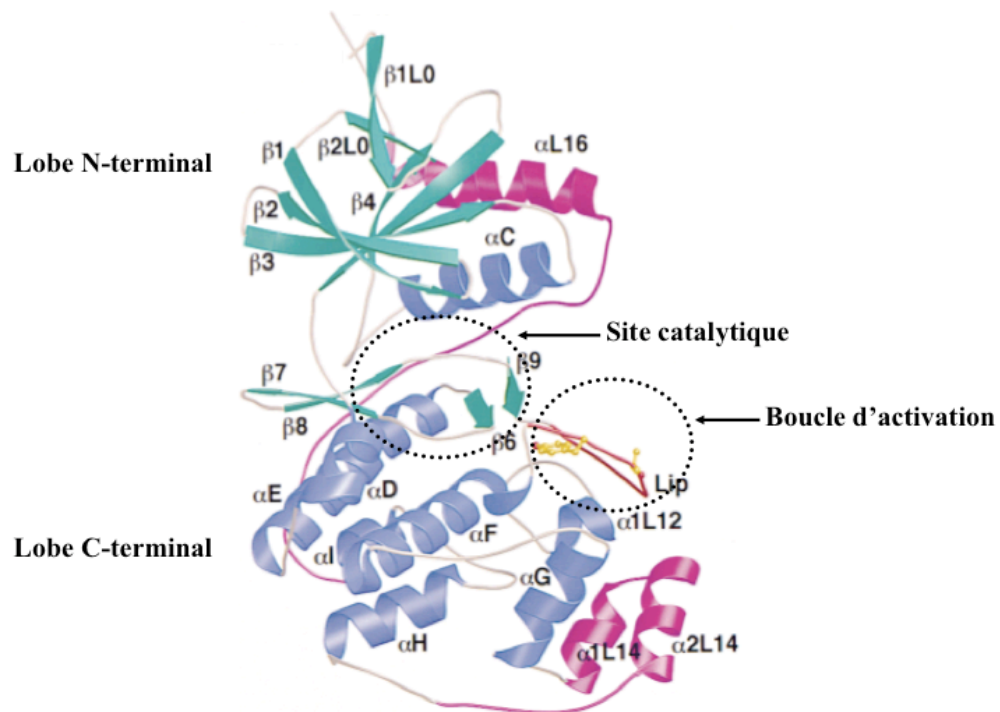


FIG. 4. Représentation de la structure tertiaire des kinases.

Les kinases adoptent une conformation bi-lobaire. Le site catalytique est situé à l'interface entre les deux lobes. La boucle d'activation est située dans le lobe C-terminal. Adapté de la structure de Erk2 sous la forme inactive (37).

1.1.4 Mécanismes d'activation

Pour la majorité des kinases, la phosphorylation de la boucle d'activation est nécessaire pour que la kinase soit active. Cette phosphorylation induit un changement de conformation important au niveau de la boucle d'activation et contribue au rapprochement des lobes N- et C-terminal (37, 132, 204). Elle participe à l'alignement des résidus essentiels à la catalyse ainsi que le positionnement de l'ATP et permet d'exposer le site de reconnaissance du substrat (FIG.5).

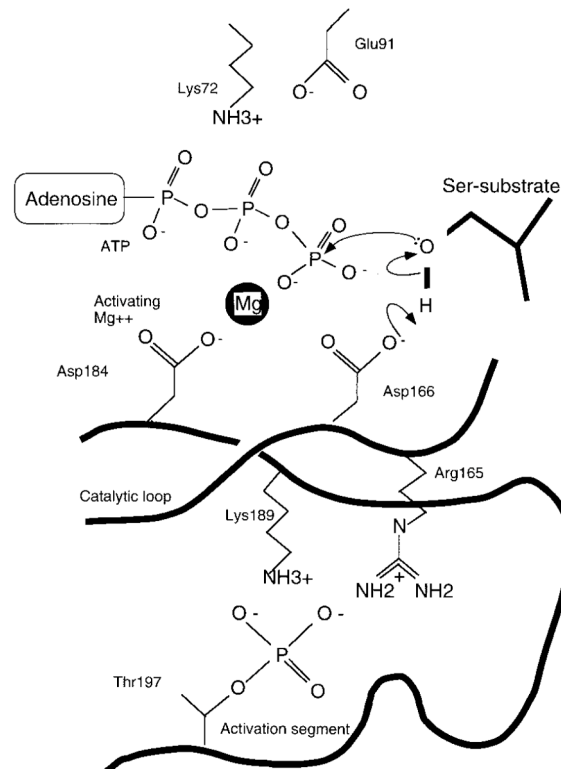


FIG. 5. Représentation de l'environnement de la boucle d'activation des kinases lorsque phosphorylée.

Représentation de la PKA (protéine kinase A). La phosphorylation de Thr¹⁹⁷ de la boucle d'activation induit un changement de conformation et permet d'aligner les résidus impliqués dans la catalyse, l'ATP et le groupement hydroxyle du substrat.. Tiré de (132).

La phosphorylation de la boucle d'activation peut se faire par une autre kinase comme elle peut être le résultat d'une auto-phosphorylation. Par exemple, les MAP kinases Erk1/2 et Jnk (c-Jun N-terminal kinase) sont phosphorylées sur leur boucle d'activation par les MAP kinases kinases MEK1/2 et MKK4/7 respectivement (37, 65, 210) alors que

d'autres kinases, comme PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1) (39), vont s'auto-phosphoryler sur leur boucle d'activation. Dans les deux cas, la boucle d'activation de ces kinases est phosphorylée en *trans*, c'est-à-dire qu'elle est le résultat d'une réaction inter-moléculaire et non intra-moléculaire (en *cis*).

Quelques évidences laissent suggérer que l'auto-phosphorylation de certaines kinases résulte également d'une réaction intra-moléculaire. Cela semblerait être le cas pour les kinases DYRKs (dual-specificity-tyrosine-phosphorylation-regulated protien kinase) (169) et GSK3 β (glycogene synthase kinase 3 β) (168) pour lesquelles il a été proposé que la kinase adopte un état intermédiaire et transitoire lors de la traduction qui lui permet alors de s'auto-phosphoryler en *cis*.

Pour certaines kinases, la phosphorylation de la boucle d'activation est suffisante pour que la kinase soit pleinement active. C'est le cas des membres de la famille des MAP kinases Erk1/2, Jnk, p38 et Erk5 (47, 210). Pour d'autres, l'activation implique également une interaction avec d'autres protéines. Par exemple, pour les CDKs (cyclin-dependent kinase), la liaison avec les cyclines est nécessaire pour induire un changement de conformation majeur qui permet alors aux CDKs d'être phosphorylées sur leur boucle d'activation par la kinase CAK (CDK-activating kinase) (127, 188, 205). De plus, l'activation des Cdk requière que deux résidus, une thréonine et une tyrosine, situés à l'extrémité N-terminale de la protéine soient déphosphorylés par la phosphatase Cdc25 (188, 205).

L'activation de la PKA (protéine kinase A) est également régulée par des interactions protéines-protéines (130, 152). Cette kinase est constituée de 2 sous-unités catalytiques (C₂) qui contiennent le domaine kinase, et de 2 sous unités régulatrices (R₂). Les sous-unités C sont phosphorylées sur la boucle d'activation de manière constitutive (auto-phosphorylation). Cependant, elles sont maintenues inactives par les sous unités R. Ces dernières possèdent un motif qui agit à titre de pseudo-substrat. Ce motif se lie au site de reconnaissance du substrat des sous-unités C afin d'inhiber leur activité. L'augmentation des niveaux d'AMPC (adénosine monophosphate cyclic), un second messenger produit par l'activation de l'adénylate cyclase, permet de relâcher cette inhibition. L'AMPC se lie aux

sous-unités R, ce qui induit alors un changement de conformation important qui entraîne la dissociation du complexe.

L'activation des kinases est également régulée par des interactions intra-moléculaires. C'est le cas par exemple de la kinase Src (sarcoma kinase) (224, 289, 290). Src possède deux domaines situés en N-terminal du domaine kinase, soit un domaine SH2 et SH3. Ces domaines sont connus pour interagir avec les protéines qui possèdent des résidus tyrosines phosphorylés et des régions riches en résidus prolines, respectivement. Src est maintenue dans une forme catalytiquement inactive via la phosphorylation, par la kinase Csk (c-Src tyrosine kinase), d'une tyrosine présente dans sa queue C-terminale et via une région riche en résidus prolines, située entre le domaine kinase et le domaine SH2. Ceci a pour conséquence de lier le domaine SH2 et SH3, et bien que les régions touchées par ces interactions soient éloignées de la boucle d'activation, de replier la kinase et d'assurer une rigidité qui l'empêche d'adopter une conformation active. Cette inhibition est relâchée lorsque la tyrosine en C-terminal est déphosphorylée ou encore lorsque les domaines SH2 et/ou SH3 sont recrutés par d'autres ligands, ce qui permet alors à Src de s'auto-phosphoryler sur sa boucle d'activation et d'être pleinement active.

Ainsi, bien que les kinases présentent énormément de similitudes entre-elles au niveau de leur domaine kinase, différents mécanismes d'activation prennent place afin d'activer les différentes kinases au moment opportun.

1.2 Les MAP kinases

Les MAP (mitogen-activated protein) kinases sont des sérine/thréonine kinases impliquées dans plusieurs voies de signalisation cellulaire. Ces voies de signalisation permettent de moduler et de contrôler la réponse cellulaire afin que la cellule puisse répondre de manière adéquate aux divers stimuli extracellulaires environnants. Les MAP kinases jouent un rôle important dans l'embryogenèse, la prolifération et différenciation cellulaire, la réponse immunitaire, l'apoptose, la survie cellulaire et la réponse au stress (43, 75, 210, 285).

Les MAP kinases font partie d'une grande famille d'enzymes très conservées dans l'évolution, de la levure jusqu'à l'homme (75, 285). Ces enzymes font partie de modules kinase dont l'activation implique la phosphorylation en série de trois kinases soit une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK ou MEKK), une MAP kinase kinase (MAPKK ou MEK/MKK) et une MAP kinase (MAPK). Chez les mammifères, les MAP kinases définissent 7 voies de signalisation distinctes (47, 58) (FIG.6.). Cette famille comprend 14 membres, soit Erk1 et Erk2 (Extracellular signal-regulated kinase), Jnk 1, 2 et 3 (c-Jun N-terminal kinase) et p38 α , β , δ et γ et Erk5 considérées comme des MAP kinases classiques, ainsi que, Erk7(Erk8), Nlk (nemo-like kinase), Erk3 et Erk4. Ces dernières sont considérées comme atypiques ou non-conventionnelles à cause de leurs particularités respectives par rapport aux MAP kinases classiques.

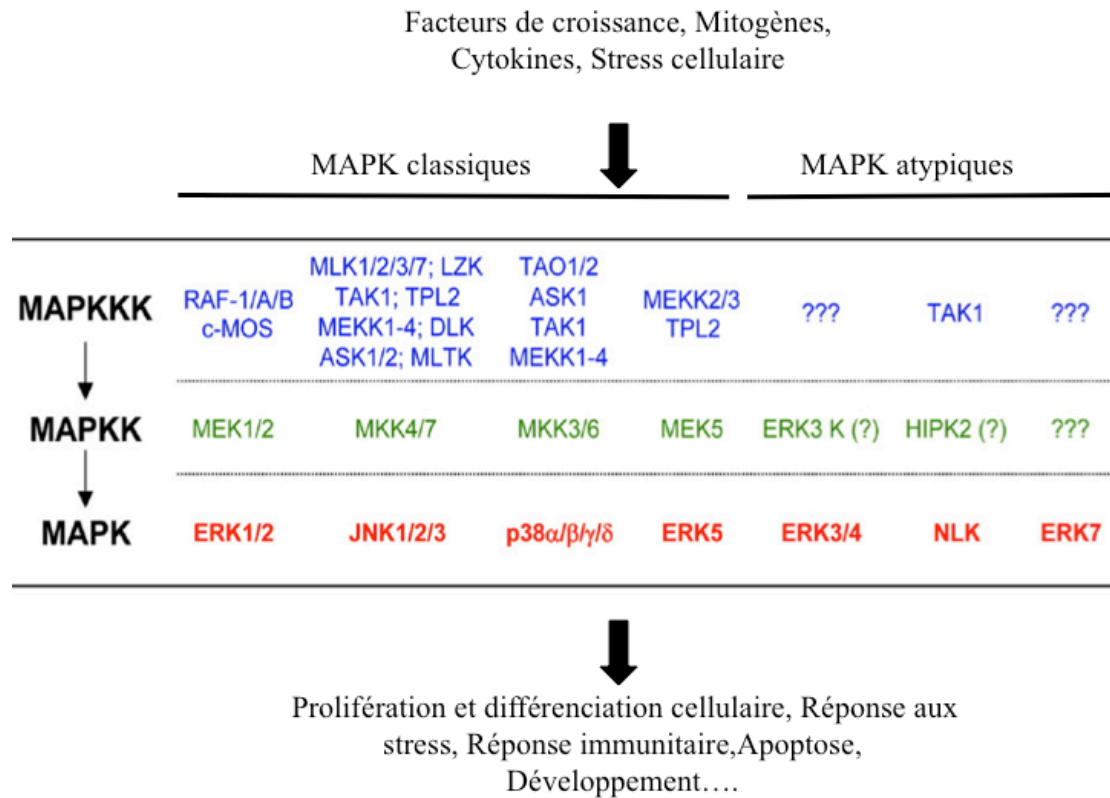


FIG. 6. Les MAP kinases définissent 7 voies de signalisation distinctes.

Les différentes voies de signalisation ont été nommées en fonction des MAP kinases qu'elles activent, soit la voie Erk1/2, Jnk, p38, Erk5, Erk3/4, Nlk et Erk7. Adapté de (58).

1.2.1 Les MAP kinases classiques

1.2.1.1 Erk1/2, Jnk et p38

1.2.1.1.1 Identification

L'identification des MAP kinases classiques s'est déroulée vers la fin des années 80 et le début des années 90. Erk1 a été la première sérine/thréonine kinase identifiée et caractérisée comme étant elle-même phosphorylée en réponse à l'insuline sur deux résidus, soit une tyrosine et une thréonine (218). Cette kinase s'avéra être la même enzyme caractérisée par d'autres groupes comme étant phosphorylée sur un résidu tyrosine en réponse à d'autres facteurs de croissance, tels le PDGF (platelet-derived growth factor) et l'EGF (epidermal growth factor)(56) ainsi que par les esters de phorbol, tel le TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) (145). Au début des années 90, le cDNA de Erk1 a été isolé (28) puis en 1991 celui de Erk2 (27).

En réponse à un stress, Jnk, aussi appelé SAPK (stress-activated protein kinase), a d'abord été purifiée à partir du foie de rat traité à la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique (161). Parallèlement, elle a été identifiée comme étant activée en réponse aux ultraviolets et responsable de la phosphorylation en N-terminal du facteur de transcription c-Jun (110, 214). En 1994, le cDNA de Jnk1 a été isolé (69, 162), ce qui a permis par la suite d'identifier deux autres membres de cette sous-famille de kinases, soit Jnk2 et Jnk3 (96).

En 1994, p38, une autre MAP kinase activée en réponse au stress a été identifiée par trois groupes de recherche. D'une part, p38 a été identifiée comme une kinase elle-même phosphorylée sur une tyrosine en réponse à un stress causé par des endotoxines et par une hyper-osmolarité (98). D'autre part, en réponse à l'IL-1 (interleukine) et à l'arsenite, elle a été identifiée comme la kinase de MK2 (MAP kinase-activated protein kinase 2 MAPKAPK2) (225). Parallèlement, p38 a été identifiée suite à sa caractérisation comme étant une cible de l'inhibiteur pharmacologique SB203580 permettant l'inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF α (tumor necrosis factor α) (164). Au cours des années qui suivirent, trois autres isoformes ont été identifiées soit p38 β (128), p38 γ (166) et p38 δ (129).

1.2.1.1.2 Identité protéique et structure

Erk1 et Erk2 sont des protéines de 44 et 42kDa respectivement. Ces deux isoformes possèdent 85% d'identité protéique entre-elles. Les différentes isoformes de Jnk partagent environ 40% d'identité protéique avec Erk1 au niveau du domaine kinase et 87% entre-elles. La portion C-terminale varie de taille, ce qui engendre des protéines de 46 et 54 kDa. Les différentes isoformes de p38, allant de 38kDa à 43kDa, présentent entre 40 et 50% d'identité protéique avec Erk1 à l'intérieur du domaine kinase et plus de 60% entre-elles.

Les MAP kinases classiques sont principalement constituées d'un domaine kinase. Leur boucle d'activation est définie par la présence du motif TXY, motif très conservé chez cette famille de kinase (100, 101). La phosphorylation de la thréonine et de la tyrosine composant ce motif entraîne l'activation des MAP kinases. Cette double phosphorylation est essentielle pour l'activité enzymatique puisque, tel que démontré pour Erk2, la mutation de la Tyr¹⁸³ ou de la Thr¹⁸⁵ par un résidu alanine ou phénylalanine abolit totalement l'activité kinase (222).

Les MAP kinases phosphorylent leurs substrats sur un résidu sérine ou thréonine suivi d'une proline (proline-directed kinase). Le lobe C-terminal contient le site impliqué dans la reconnaissance du substrat, appelé le site P+1, qui lie spécifiquement les substrats contenant la séquence consensus Pro-X-Ser/Thr-Pro. Le site P+1 est contigu à la boucle d'activation. La phosphorylation par une kinase des résidus Thr et Tyr (motif TXY) de la boucle d'activation engendre l'activation des MAP kinases, ce qui permet le rapprochement des lobes N- et C-terminal, l'alignement des résidus essentiels à la catalyse ainsi que l'exposition du site P+1 (37, 132).

Les MAP kinases possèdent également des domaines spécifiques d'interaction protéique. Le premier domaine identifié, le domaine CD (common Docking), est particulièrement conservé chez les MAP kinases classiques. Ce domaine est composé du motif DXX(D/E) (229, 267). La présence de ces résidus acides permet aux MAP kinases d'interagir avec des partenaires qui possèdent un motif composé de résidus basiques et hydrophobes, appelé le domaine D (docking). Ce domaine est présent sur plusieurs substrats des MAP kinases dont c-Jun, RSK1-4 (p90 Ribosomal S6 Kinase) et MK2, sur

des kinases activatrices dont MEK1 ainsi que sur toutes les phosphatases MKPs (MAP kinase phosphatase) (133, 228, 267, 268, 300).

Au cours des années 2000, d'autres domaines d'interaction, dont le domaine ED composé de résidus acides et le sillon hydrophobe, ont été caractérisés suite à la cristallographie des MAP kinases classiques, seules et en complexe avec différents substrats, activateurs, phosphatases et inhibiteurs (9, 42, 109, 268, 308). Ces études ont permis de montrer que ces domaines d'interaction augmentent la spécificité de liaison entre les différentes MAP kinases et leurs partenaires respectifs. Elles ont aussi permis de révéler que la liaison des différents partenaires affecte de manière différente la conformation des MAP kinases.

1.2.1.1.3 Profil d'expression

Erk1 et Erk2 sont exprimées de façon ubiquitaire tout en présentant un patron d'expression variable selon les tissus et le type cellulaire. Elles sont fortement exprimées dans le cerveau, le muscle squelettique, le thymus et le cœur (27).

Jnk1 et Jnk2 sont également des protéines ubiquitaires alors que l'expression de Jnk3 se limite au système nerveux, au cœur et aux testicules (131, 299).

p38 α et p38 β sont aussi exprimées de façon ubiquitaire (128). Quant aux deux autres isoformes, p38 γ est fortement exprimée dans le muscle squelettique alors que p38 δ est principalement exprimée dans les testicules, le pancréas, le rein et l'intestin (90).

1.2.1.1.4 Voies de signalisation

1.2.1.1.4.1 Activation

Erk1 et Erk2 sont principalement activées en réponse aux facteurs de croissance, tel l'EGF, le PDGF, le NGF (nerve growth factor) et en réponse à l'insuline (27). Jnk et p38 sont principalement activées par différents stress cellulaires (hyper-osmolarité, rayons ultraviolets) (98, 164) ainsi qu'en réponse aux cytokines dont IL-1 et le TNF α (252) (84, 215).

L'activation de la voie Erk1/2 implique principalement les récepteurs RTKs (récepteur tyrosine kinase). Dans un premier temps, la liaison du ligand va induire l'homodimérisation du récepteur et son autophosphorylation *en trans*. Cet état de phosphorylation va permettre le recrutement de la protéine adaptatrice GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) et de l'échangeur nucléotidique guanylique SOS (son of sevenless). SOS va par la suite activer la petite GTPase Ras en échangeant le GDP (guanosine 5'-diphosphate), lié à la forme inactive de Ras, pour le GTP (guanosine 5'-triphosphate). La conversion de RasGDP en RasGTP va conduire à l'activation de Raf, la première kinase du module kinase Erk1/2 (180). La voie Erk1/2 peut également être activée par les récepteurs GPCRs (G-protein-coupled receptor). Dans ce cas, l'activation de Raf peut se faire via des mécanismes qui dépendent ou non de l'activation de Ras (91, 180).

L'activation des voies Jnk et p38 implique entre autre les récepteurs de cytokines dont TNFR1/2 (tumor necrotic factor receptor 1/2), via le recrutement de TRAF2 (TNFR-associated factor 2) (196, 303) ainsi que le récepteur à l'IL-1, via le recrutement de TRAF6 (170). Le recrutement des protéines adaptatrices TRAFs va par la suite entraîner l'activation des MAPKKKs du module kinase Jnk et p38 (53, 119). Ces deux voies de signalisation sont également activées par les GPCRs (91, 245, 293) ainsi que par les petites GTPases de la sous-famille Rho, dont Rac et Cdc42 (15, 57).

1.2.1.1.4.2 Module kinase

L'activation du module kinases cause la phosphorylation en série de trois kinases soit une MAPKKK, une MAPKK et enfin une MAP kinase (FIG. 7).

L'activation de Erk1/2 implique principalement l'activation des MAPKKKs de la sous-famille Raf, telles Raf1 (177), A-Raf (22) et B-Raf (125). Ces kinases vont par la suite activer les MAPKKs MEK1 et MEK2 (8, 61, 306) qui elles vont phosphoryler Erk1 et Erk2. Les MAPKKKs MEKK1-3, ainsi que Tpl2/Cot sont également capables d'activer la voie Erk1/2 (20, 50, 64, 304).

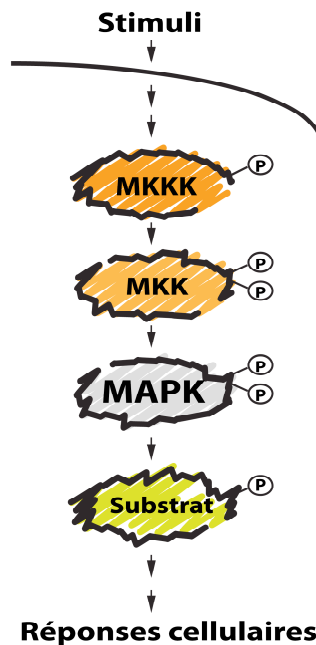


FIG .7. Activation du module kinase.

L'activation du module kinase cause la phosphorylation en série de trois kinases, soit une MAPKKK, une MAPKK et enfin une MAP kinase. P (Phosphate), S/T (Sérine/Thréonine).

Les MAPKKKs impliquées dans l'activation de Jnk et p38 sont très nombreuses. Dans des expériences de surexpression et *in vitro*, la plupart de ces MAPKKKs sont capables d'engendrer l'activation de Jnk et p38 à différentes échelles. Par conséquent, la spécificité de ces enzymes au niveau physiologique reste encore ambiguë. Parmi elles, on retrouve TAK1 (TGF- β -activated kinase) (291), ASK1 (apoptosis signal regulating kinase 1) (120), Tpl2/Cot (50, 64), MEKK1-3 (20, 67, 296), MLK2/3 (mixed lineage kinase 2/3) (111, 273) ainsi que DLK (dual-leucine zipper kinase) (82), qui semblent quant à elles plus spécifiques à la voie Jnk et TAO-1 (thousand and one-1) (118) spécifique à la voie p38. Ces MAPKKKs vont par la suite activer les kinases activatrices de Jnk et p38, soit MKK4 (236) et MKK7 (275) ainsi que MKK3 (70) et MKK6 (99, 189), respectivement.

1.2.1.1.4.3 Substrats

Les MAP kinases ont un nombre impressionnant de substrats, ce qui explique pourquoi leurs fonctions sont si nombreuses et diversifiées (210, 302). Erk1/2 ont comme substrat plusieurs kinases dont RSK1/4 et MSK1/2 (mitogen and stress-activated kinase 1/2) (228) ainsi qu'un grand nombre de facteurs de transcription dont Elk-1 (ETS-like-1) (88), Sap-1 (SRF accessory protein) (126), c-Fos (46) et c-Myc (66).

Les substrats de Jnk sont presque exclusivement des facteurs de transcription, dont c-Jun (69), ATF-2 (Activating transcription factor) (97), p53 (115) et Elk-1 (310). Ce dernier est d'ailleurs un point de convergence entre la voie Erk1/2 et Jnk (310).

p38 compte aussi parmi ses substrats plusieurs facteurs de transcription dont ATF-2 (215) et Sap-1 (212), point de convergence entre la voie Erk1/2 et p38 (211), ainsi que plusieurs protéines kinases dont MNK1/2 (MAPK-interacting kinase 1/2) (228), MSK 1/2 (13), MK2(225) et MK5/PRAK (p38-regulated/activated kinase) (199).

1.2.1.1.4.4 Régulation par les protéines d'échaffaudages

Les protéines d'échaffaudage jouent un rôle important dans la régulation de l'activité kinase. Elles contribuent à assurer une réponse plus spécifique et une activation rapide du module kinase en mettant à proximité les différentes composantes de ce module (73, 191, 283). Parallèlement, elles vont influencer sur la localisation des kinases ou encore empêcher leurs interactions avec d'autres protéines afin de prévenir une activation inadéquate (73, 191, 283). Chez les mammifères, on retrouve entre autres les protéines d'échaffaudage KSR (kinase suppressor of Ras) et Paxillin impliquées dans l'assemblage du module kinase Erk1/2, ainsi que les protéines de la famille JIP (Jnk-interacting protein) quant à elles impliquées dans l'assemblage du module kinase Jnk et p38 (73, 191, 283).

1.2.1.1.4.5 Inactivation par les protéines phosphatases

L'activation des MAP kinases est associée à la phosphorylation de deux résidus, soit une thréonine et une tyrosine, présents dans la boucle d'activation. L'état de phosphorylation de cette boucle d'activation se doit d'être finement régulé afin qu'en réponse aux stimuli extracellulaires, les différentes voies de signalisation MAP kinases soient activées de manière spécifique et que la durée et la magnitude de cette activation soient modulables. Cet état de phosphorylation est régulé d'une part par les kinases activatrices en amont des MAP kinases et d'autre part par la présence dans le cytoplasme et dans le noyau d'un grand nombre de phosphatases de diverses spécificités.

Les MKPs ou DUSPs (dual specificity phosphatase) sont des phosphatases à double spécificité capables de déphosphoryler les résidus thréonine et tyrosine (207). Cette famille

de phosphatases compte 10 membres dont MKP-3, spécifique à Erk1/2 (192), MKP-5 spécifique à Jnk et p38 (192, 270) et MKP-1 capable d'inactiver Erk1/2, Jnk et p38 (52). En plus de la spécificité de liaison des MKPs pour les différentes MAP kinases, l'inactivation adéquate des MAP kinases est assurée par la régulation spatio-temporelle de ces phosphatases. Par exemple, certaines MKPs sont régulées au niveau transcriptionnel et localisées dans le noyau, tel que MKP-1 alors que d'autres, sont activées de façon post-transcriptionnelle et majoritairement cytosoliques, tel que MKP-3 (146). De plus, plusieurs stimuli des voies MAP kinases sont capables d'induire l'expression des MKPs (264), ce qui suggère que ces enzymes font également partie d'un mécanisme de régulation rétroactive négatif.

Puisque l'activation des MAP kinases nécessite la phosphorylation des deux résidus présent dans la boucle d'activation, soit une thréonine et une tyrosine, la déphosphorylation d'un seul de ces résidus conduit à l'inactivation des MAP kinases. Ainsi, en plus des MKPs à double spécificité, les sérine/thréonine phosphatases (PP), dont PP2C, ainsi que les tyrosines phosphatases (PTP), dont HePTP (hematopoietic PTP) et STEP (striatal enriched phosphatase), sont aussi impliquées dans l'inactivation des MAP kinases (146, 264). De plus, certaines de ces phosphatases sont capables d'inactiver plusieurs membres d'une même voie MAP kinase. Par exemple, PP2A peut inhiber la voie Erk1/2 et p38 via la déphosphorylation de MEK1/2 (135, 281) et de MKK3, respectivement (213) alors que PP2C peut aussi déphosphoryler MKK4 et MKK6 (262, 265).

1.2.1.1.4.6 Fonctions

1.2.1.1.4.6.1 Erk1/2

1.2.1.1.4.6.1.1 Prolifération cellulaire

Erk1/2 sont d'importants régulateurs de la croissance et de la prolifération cellulaire. Elles sont rapidement activées (5-10 min) par les mitogènes. Cette activation se traduit par une augmentation forte et transitoire de l'activité Erk, suivi d'une deuxième phase d'activité plus faible mais soutenue qui persiste jusqu'à la fin de la phase G1 du cycle cellulaire (181, 186). L'activation soutenue de Erk1/2 est nécessaire pour permettre la transition G1/S (195, 292).

La première évidence directe de l'implication de Erk1/2 dans le contrôle de la prolifération découle de l'observation que la surexpression d'une forme catalytiquement inactive de Erk1 ou l'utilisation d'ARN anti-sens contre Erk1/2 exerce un effet dominant négatif sur la prolifération des fibroblastes (208). L'utilisation d'un mutant dominant-négatif de MEK1 (241), d'inhibiteur (72) ou encore d'une forme constitutivement active de MEK (30) a aussi permis de confirmer l'importance de cette voie de signalisation dans la prolifération cellulaire.

Erk1/2 exercent un contrôle sur la prolifération cellulaire de plusieurs manières. Erk1/2 phosphorylent et activent le facteur de transcription Elk-1, ce qui induit l'expression de gènes précoces (IEG) dont celle du proto-oncogène c-Fos (88, 89, 113). De plus, Erk1/2 phosphoryle c-Fos, ce qui augmente sa stabilité et conduit à son accumulation (195). Parallèlement, c-Fos se lie avec c-Jun et forme le facteur de transcription AP-1 (activating protein 1) (284). Le facteur de transcription AP-1 est également un important régulateur de l'expression de gènes précoces (140). Une autre cible importante de ce facteur de transcription est le gène de la cycline D1 (10, 246). Les cyclines D en complexe avec les Cdk (cyclin-dependent kinase) permettent la transition de la phase G1/S et la progression du cycle cellulaire (248).

En parallèle, Erk1/2 régulent l'expression de gènes pro-prolifératifs en activant les MAPKAP kinases RSK1/2 et MSK1/2 (228, 271). Les RSKs phosphorylent et activent plusieurs facteurs de transcriptions, dont CREB (cAMP response element-binding protein) (288), SRF (serum response factor), impliqués dans l'expression de gènes précoces. MSK1/2 phosphorylent aussi le facteur de transcription CREB (286). Ces deux kinases jouent également un rôle important au niveau de la réponse nucléosomale en phosphorylant les histones H3 et la protéine HMG-14 (high-mobility-group protein) afin de remodeler la chromatine et de réguler l'activité transcriptionnelle (255).

Erk1/2 contrôlent également la prolifération en stabilisant le proto-oncogène c-Myc (240), un important régulateur de la croissance cellulaire, de la progression du cycle cellulaire et de l'apoptose (80).

En plus de contrôler la transition G1/S (185), Erk1/2 joue un rôle dans la synthèse protéique. Erk1/2 régulent de manière positive l'activité de mTOR (mammalian Target of rapamycin) en inactivant le complexe TSC1/2 (tuberous sclerosis complex 1/2) (38, 172, 227), un régulateur négatif de l'activité de mTOR. mTOR joue un rôle essentiel dans la croissance cellulaire, la biogénèse des ribosomes et l'initiation de la traduction en réponse aux facteurs de croissance et en fonction de la disponibilité en nutriments (106). mTor joue également un rôle important dans la synthèse des lipides, le métabolisme et la biogénèse des mitochondries.(163)

En plus de jouer un rôle dans la synthèse protéique, Erk1/2 régulent également la synthèse nucléotidique en activant la carbamoyl-phosphate synthétase, enzyme impliquée dans l'étape limitante de la synthèse des nucléotides pyrimidiques (94).

Évidemment, l'importance de Erk1/2 dans le contrôle de la prolifération fait en sorte que ces deux kinases sont aussi impliquées dans la croissance des cellules tumorales. Une suractivation de la voie Erk1/2 est d'ailleurs suffisante pour induire la transformation des cellules (176, 279). De plus, une activation constitutive et aberrante de la voie Erk1/2, due à des mutations dans la petite GTPase Ras ou la MAPKKK Raf, est un événement fréquent dans plusieurs types de cancers (74, 79).

1.2.1.1.4.6.1.2 Différenciation cellulaire

Erk1/2 jouent un rôle essentiel dans le développement des thymocytes. L'inactivation conditionnelle de Erk2 au cours du développement des thymocytes a révélé que Erk2 joue un rôle important dans la sélection positive, principalement pour la maturation des thymocytes SP CD4⁺ (83). De plus, la différenciation des cellules DP en cellules SP est complètement abolie suite à l'inactivation additionnelle de Erk1 (83).

Erk1 joue également un rôle dans la différenciation des adipocytes (25, 26). Les souris Erk1^{-/-} ont moins de tissus adipeux et elles sont résistantes à l'obésité induite par une diète riche en gras (25). En accord avec le phénotype observé, les souris Erk1^{-/-} présentent un défaut au niveau de l'adipocytogénèse (25). Une diminution du réservoir de cellules pré-adipocytes semble en être la cause.

1.2.1.1.4.6.1.3 Fonctions cognitives

L'inhibition de la voie Erk1/2 par des inhibiteurs pharmacologiques de MEK, dont le PD9805, le U0126 et le SL327, a permis de révéler l'implication de Erk1/2 dans les fonctions cognitives. En effet, les rats dont l'activité Erk est inhibée présentent des difficultés d'apprentissage (242) et de mémoire à long terme (14, 238, 280).

D'autre part, l'inactivation conditionnelle de Erk2 chez la souris dans les cellules neuronales progénitrices du cortex cérébral provoque chez ces animaux un déficit profond d'apprentissage dans certains tests de conditionnement par la peur (235). À l'opposé, l'analyse des souris Erk1^{-/-} lors de tests semblables a montré que ces animaux ont une meilleure capacité d'apprentissage et de mémoire à long terme (179). Le phénotype observé semble attribuable à une augmentation de l'activité de Erk2 (179). Ces résultats confirment le rôle positif de Erk2 dans les fonctions cognitives et d'autre part que les niveaux de Erk1 sont importants pour empêcher une sur-activation de Erk2 (179).

De façon intéressante, l'inhibition de Erk1/2 induit également un blocage de la mémoire à long terme des comportements induit par la cocaïne, suggérant ainsi que Erk1/2 pourraient être impliquées dans l'effet de dépendance causé par les drogues (278).

1.2.1.1.4.6.1.4 Développement

Contrairement aux souris Erk1^{-/-}, les souris nulles pour le gène Erk2 meurent au cours du développement embryonnaire (105, 230, 301). Dans un fond génétique C57BL/6, l'inactivation de Erk2 conduit à une létalité très précoce dans le développement embryonnaire (E8.5), due à un défaut dans la formation du cône ectoplacentaire et de l'ectoderme extra-embryonnaire responsable de la formation de la partie fœtale du placenta (230). Dans un fond génétique BALB/C, la létalité embryonnaire survient un peu plus tôt dans le développement (E6.5) suite à un défaut de maturation du mésoderme (301). Enfin, une dernière étude arrive à la conclusion que le phénotype de létalité embryonnaire résulte d'un défaut du développement du placenta (105).

L'inactivation conditionnelle de Erk2 dans le tube neuronal a permis de confirmer le rôle essentiel de Erk2 dans le développement de l'embryon lui-même. En effet, les souris Erk2^{-/-} conditionnelles meurent au cours du développement embryonnaire et présentent un défaut majeur de développement du tube neural, ce qui entraîne des anomalies au niveau cardiaque et crânio-facial (200). De plus, l'inactivation additionnelle de Erk1 chez ces animaux aggrave le phénotype observé. L'activité Erk globale semble donc avoir un effet dose-dépendent sur le développement du tube neural (200).

1.2.1.1.4.6.2 Jnk

1.2.1.1.4.6.2.1 Prolifération cellulaire

Jnk1 et Jnk2 sont impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Les MEFs (Mouse embryonic fibroblast) Jnk1^{-/-}Jnk2^{-/-} (231, 274) ainsi que les MEFs c-Jun^{AA63/73} exprimant une forme non-phosphorylable de c-Jun (17) présentent un défaut sévère de prolifération. De manière surprenante, la délétion individuelle de ces gènes n'a pas le même effet sur la prolifération. En effet, les MEFs Jnk1^{-/-} présentent un défaut de prolifération, alors que les MEFs Jnk2^{-/-} prolifèrent davantage (231, 274). Découlant de cette observation, il a été proposé que Jnk1 et Jnk2 régulent de manières différentes l'activité du proto-oncogène c-Jun (231). Cependant, une étude utilisant une autre approche pour inactiver Jnk2, a montré que Jnk1 et Jnk2 ont le même effet positif sur la régulation de c-Jun et que l'augmentation de la prolifération observée suite à l'inactivation génique de Jnk2 reflète plutôt une augmentation de l'activité de Jnk1 (124).

1.2.1.1.4.6.2.2 Différenciation cellulaire

Jnk1 et Jnk2 jouent un rôle important dans la différenciation des thymocytes. D'une part, les souris Jnk2^{-/-} présentent un défaut de maturation des cellules T (thymocyte) CD4⁺ en cellules effectrices Th1 (T helper) (298). D'autre part, chez les souris Jnk1^{-/-}, les cellules T CD4⁺ se différencient préférentiellement en cellules effectrices Th2 (77). Ainsi, Jnk1 et Jnk2 régulent de manière différente le développement des lymphocytes T afin de favoriser la différenciation des cellules T CD4⁺ vers la lignée Th1. En accord avec cela, les cellules T CD4⁺ dont Jnk1 et Jnk2 sont absentes se différencient préférentiellement en cellules Th2 (76).

1.2.1.1.4.6.2.3 Apoptose

Jnk joue un rôle important dans l'apoptose en réponse à certains stress cellulaires. Les cellules neuronales Jnk3^{-/-} sont résistantes aux dommages causés par un stress excitotoxique (299). En effet, en réponse à l'acide kaïnique, les souris Jnk3^{-/-} ont un taux de survie plus élevé et présentent peu ou pas d'apoptose dans la région cérébrale la plus touchée par l'acide kaïnique, soit l'hippocampe. Ce phénotype est associé à une diminution de l'état de phosphorylation et de l'activité de c-Jun, suggérant que le rôle de Jnk3 dans l'apoptose est dépendant du facteur de transcription c-Jun. En accord avec ces résultats, les cellules neuronales issues des souris exprimant une forme non-phosphorylable de c-Jun, c-Jun^{AA63/73}, sont résistantes à l'apoptose induite par l'acide kaïnique (17).

Jnk1 et Jnk2 sont également impliquées dans l'apoptose en réponse à un stress. Les MEFs Jnk1^{-/-};Jnk2^{-/-} sont résistantes à l'apoptose induite par les rayonnements UV (ultraviolet) et le MMS (methyl-methane-sulfonate), qui cause des dommages à l'ADN, ainsi que par l'anisomycine, un inhibiteur de la traduction (274). En réponse aux rayons UV, l'inactivation de Jnk1 et de Jnk2 se traduit par une diminution du relargage du cytochrome c et par un défaut de dépolarisation de la membrane mitochondriale (274), un événement tardif de l'apoptose. Ainsi, il semblerait que Jnk1 et Jnk2 soient impliquées dans la voie intrinsèque de l'apoptose dans certaines conditions de stress.

1.2.1.1.4.6.2.4 Développement

Les souris Jnk1^{-/-} (77), Jnk2^{-/-} (298), Jnk3^{-/-} (299), Jnk1^{-/-}Jnk3^{-/-} et Jnk2^{-/-}Jnk3^{-/-} se développent normalement (232). Cependant, l'inactivation de Jnk1 et de Jnk2 a permis de révéler que ces deux isoformes sont essentielles au développement cérébral. En effet, les souris Jnk1^{-/-}Jnk2^{-/-} meurent au cours du développement embryonnaire (E10.5-11.5) et présentent un défaut de fermeture du tube neural se traduisant par une exencéphalie dans la région du rhombencéphalon (hindbrain) (159, 232). Un dérèglement de l'apoptose nécessaire au développement cérébral serait responsable du phénotype observé (159, 232).

1.2.1.1.4.6.3 p38

1.2.1.1.4.6.3.1 Production de cytokines pro-inflammatoires

p38 joue un rôle essentiel dans la production de cytokines pro-inflammatoires. En effet, p38 est un important régulateur de la production de IL-1, du TNF α (164) et de IL-12 (171) en réponse à un choc endotoxique causé par le LPS (lipopolysaccharide). De plus, p38 régule la production de IL-6 en réponse à l'IL-1 (11) ainsi que celle de IL-1 et de l'IL-6 en réponse au TNF α (287).

L'une des fonctions majeures de p38 dans le contrôle de la production de cytokines inflammatoires est de réguler la stabilité et la traduction de l'ARNm. En effet, la sécrétion et l'augmentation des niveaux d'ARNm de IL-12 sont inhibées dans les macrophages issus des souris MKK3^{-/-} traitées au LPS, et où l'activité de p38 est réduite de 50% (171). Pareillement, les MEFs MKK3^{-/-} traitées au TNF α présentent des niveaux d'ARNm de IL-1 et de IL-6 sévèrement compromis (287).

Ces cytokines ont en commun de posséder des éléments riches en adénosines et uridines (AU-rich element, ARE) présents dans la région 3'UTR de leur ARNm. Ces éléments de contrôle sont connus pour réguler de manière négative la stabilité de l'ARNm (45) et dans certains cas, la traduction de l'ARNm (158). p38 contrôle la production de cytokines pro-inflammatoire en régulant la stabilité et la traduction de l'ARNm de ces cytokines par un mécanisme qui implique les éléments ARE (68). La délétion des éléments ARE du TNF α chez la souris a permis de montrer que ces régions régulent la stabilité et la traduction et qu'en réponse au LPS, cette régulation est dépendante de p38 (154). En effet, alors que l'inhibition de p38 bloque la production du TNF α chez les souris de type sauvage, les souris ARE-mutantes ne répondent pas aux inhibiteurs de p38, démontrant ainsi que ces régions sont requises pour permettre à p38 de moduler la production de TNF α (154).

Le mécanisme par lequel p38 régule la stabilité et la traduction de l'ARNm via les éléments ARE n'est pas bien connu. Cependant, plusieurs évidences suggèrent fortement que le principal effecteur de p38 impliqué dans ce processus est la MAPKAP kinase MK2. D'une part, les souris MK2^{-/-} sont également résistantes à un choc endotoxique causé par le LPS et présentent une diminution marquée de la production du TNF α et de l'IL-6 (157).

D'autre part, il a été montré que MK2 régule la production du TNF α et de IL-6 au niveau post-transcriptionnel via les éléments de contrôle ARE présents dans la région 3'UTR de leur ARNm (197). Finalement, la protéine TTP (Tristetraprolin) (112), hnRNP (Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A0) (112) et PABP1 (PolyA-binding protein) (23) ont été impliquées dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm de manière MK2-dépendante. Ces protéines sont connues pour lier ou co-purifier avec les ARNm qui contiennent des éléments ARE dans la région 3'-UTR (95).

1.2.1.1.4.6.3.2 Contrôle du cycle cellulaire

p38 joue un rôle dans l'activation des points de restriction (cell cycle checkpoint) lors de la transition G1/S ainsi que G2/M. En réponse à un choc osmotique, p38 induit l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G1/S (40, 92, 148). D'une part, p38 active le facteur de transcription p53, ce qui augmente les niveaux de p21^{Cip1/Waf1} (148). L'une des fonctions de p21^{Cip1/Waf1} est d'inhiber l'activation du complexe Cdk2/cycline E (104), régulant l'entrée des cellules en phase S ainsi que l'initiation de la réplication de l'ADN (237). p21^{Cip1/Waf1} peut également inhiber la complexe Cdk4/6-cycline D (104) afin d'empêcher la phosphorylation de la protéine Rb (retinoblastoma) et ainsi l'activation de la voie pRb/E2F qui régule l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (103). D'autre part, p38 a la capacité d'induire la dégradation de la cycline D1 (40) qui en complexe avec Cdk4/6, régule la transition G1/S (248). Enfin, p38 peut également induire la dégradation de la phosphatase Cdc25A (92) dont l'une des fonctions est d'activer le complexe Cdk2-cycline E (21). Cdc25A joue un rôle important lors de la transition G1/S (203). L'arrêt du cycle cellulaire à la transition G1/S et G2/M implique d'ailleurs l'inactivation de Cdc25A (305).

p38 peut également contribuer à l'activation du point de restriction G1/S en augmentant l'expression de p16^{Ink4a} et de p19^{Arf} (33). p16 et p19 induisent l'arrêt du cycle cellulaire en inhibant l'activation du complexe Cdk4/6-cycline D (226) et en régulant de manière positive l'activité de p53, respectivement (249).

En réponse aux dommages à l'ADN, p38 joue un rôle important dans l'activation du point de restriction G2/M (31, 187). Le mécanisme conduisant à l'activation de p38 n'est

pas encore bien défini. L'activation de p38 semble d'une part dépendre de l'activation des kinases ATM (ataxia telangiectasia-mutated) et ATR (ataxia telangiectasia Rad-3-related) (220), des joueurs clés dans l'activation des points de restriction en réponse aux dommages causés à l'ADN (202). La kinase ATM ne semble toutefois pas phosphoryler directement p38 mais plutôt activer la MAPKKK TAO en amont de p38 (216). D'autre part, l'activation de p38 peut également se produire par un mécanisme indépendant de l'activation de la voie ATM/ATR. En effet, p38 est toujours activée dans les MEFs ATM^{-/-} et ATR^{-/-} en réponse aux dommages à l'ADN causés par les rayons UV (187, 220). Ce mécanisme n'a toutefois pas été identifié jusqu'à maintenant.

p38 régule le point de restriction G2/M principalement de deux manières. D'une part, p38 est impliquée dans la phosphorylation et l'activation de p53 et ainsi dans l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M (34, 247). L'une des fonctions majeures de p53 dans l'activation du point de restriction G2/M est d'induire l'expression de Gadd45 (growth arrest and DNA inducible 45 α protein), p21 ainsi que 14-3-3 σ afin d'inhiber l'activation du complexe Cdk1/cyclineB et ainsi l'entrée des cellules en mitose (269). D'autre part, p38 contribue également à l'arrêt du cycle cellulaire en inhibant la phosphatase Cdc25B (32). La phosphorylation conduisant à l'inactivation de Cdc25B ne semble toutefois pas dépendre directement de p38 mais plutôt de l'activation de MK2 situé en aval de p38 (173).

1.2.1.1.4.6.3.3 Développement

Les souris p38 α ^{-/-} meurent au cours du développement embryonnaire (E10.5-12.5) à cause d'un défaut de développement du placenta (7, 11, 193, 263). Ces souris présentent également des anomalies d'angiogénèse au niveau du sac vitellin et de l'embryon (193), ainsi qu'une diminution marquée de la taille du myocarde et une malformation des vaisseaux sanguins au niveau de la tête (7). Cependant, ces anomalies sont secondaires au défaut placentaire puisque les souris p38 α ^{-/-} se développent à terme et n'ont pas de phénotype apparent lorsque le défaut du placenta est résolu en générant les souris p38 α ^{-/-} par aggrégation tétraploïde (7). Ainsi, p38 α est requise pour le développement du placenta, mais n'est pas essentielle au développement de l'embryon lui-même.

Les autres isoformes de p38 sont non-essentiels au développement embryonnaire. En effet, l'inactivation de p38 β (16), p38 γ et p38 δ (233) chez la souris est viable et n'entraîne pas de phénotype apparent.

1.2.1.2 Erk5

1.2.1.2.1 Identification

En 1995, deux groupes ont identifié Erk5/BMK1 (big MAP kinase). Afin de découvrir de nouvelles kinases, Erk5 a été identifiée par la méthode de double hybride utilisée afin d'identifier les substrats de la MAP kinase kinase MEK5 (307), ainsi que par une approche de PCR dégénéré (165).

1.2.1.2.2 Structure et particularités

La boucle d'activation de Erk5 est composée du motif TXY, où X représente un acide glutamique tout comme Erk1/2. Au niveau du domaine kinase, Erk5 possède 51% d'identité protéique avec Erk1. Cependant, Erk5 possède une extension C-terminale de 400 acides aminés qui n'est pas présente chez les MAP kinases classiques Erk1/2, Jnk et p38. Cette extension présente un motif de localisation nucléaire (NLS) ainsi qu'un domaine de transactivation (TAD), tous deux fonctionnels (141, 294). D'ailleurs, Erk5 module l'activité de ce domaine en s'autophosphorylant sur son extension C-terminale (190).

L'extension C-terminale module également l'activité kinase de Erk5. En effet, la délétion des 100 derniers acides aminés de Erk5 semble favoriser l'activation de Erk5 par sa kinase en amont MEK5, ce qui se traduit par une augmentation de son activité kinase (35). Ainsi, l'extension C-terminale de Erk5 semble jouer un rôle d'auto-inhibition.

1.2.1.2.3 Profil d'expression

L'expression de Erk5 est ubiquitaire. Cependant, le cœur, le placenta, le poumon et le rein sont les organes où Erk5 est le plus fortement exprimée (165, 307).

1.2.1.2.4 La voie de signalisation Erk5

Erk5 est activée en réponse aux facteurs de croissance (136, 143) ainsi qu'en réponse au stress, tel un stress oxydatif ou une hyper-osmolarité (1).

L'activation de la voie Erk5 implique les récepteurs à activité tyrosine-kinase (81) ainsi que les GPCRs (91). Les MAPKKs impliquées dans l'activation Erk5 sont MEKK2 et MEKK3 (44, 81, 260) ainsi que Tpl2/Cot (50). La MAPKK MEK5 est la kinase activatrice de Erk5 (307).

Parmi les substrats de Erk5, on retrouve les facteurs de transcription MEF2 (myocyte-specific enhancer factor 2) (142, 144, 297), Sap-1 (136), Neurog-1 (Neurogenine-1) (63) ainsi que les RSKs (217).

1.2.1.2.5 Fonctions

1.2.1.2.5.1 Prolifération cellulaire

Erk5 joue un rôle dans la prolifération cellulaire en réponse au sérum, à l'EGF et au G-CSF (granulocyte-colony-stimulating factor) (78, 142, 143). Entre autres, Erk5 phosphoryle et active les facteurs de transcription MEF2, ce qui induit l'expression du proto-oncogène c-Jun (142, 178). c-Jun fait partie du complexe de facteurs de transcription AP-1, dont l'un des gènes cibles est celui de la cycline D1. D'ailleurs, une autre étude a montré que Erk5 joue un rôle dans la transition G1/S en régulant l'expression de la cycline D1 (194).

1.2.1.2.5.2 Développement

Les souris Erk5^{-/-} meurent au cours du développement embryonnaire (E9.5-E10.5) et présentent un défaut majeur au niveau du développement cardio-vasculaire (219, 254, 295).

L'inactivation conditionnelle de Erk5 a permis de révéler le rôle essentiel de Erk5 pour le maintien de l'intégrité du système vasculaire et pour l'angiogénèse (107). Contrairement aux souris Erk5^{-/-}, l'inactivation conditionnelle de Erk5 chez l'adulte entraîne la mort des souris 4 à 6 semaines suivant la perte de Erk5. Cette létalité est attribuable à une perte de l'intégrité des cellules endothéliales et une augmentation de

l'apoptose, entraînant une perte d'étanchéité des vaisseaux sanguins et ainsi des hémorragies dans plusieurs organes.

L'inactivation conditionnelle de Erk5 dans les cardiomyocytes a permis de révéler que le défaut cardio-vasculaire observé chez les souris Erk5^{-/-} est une conséquence indirecte de la perte de Erk5 puisque les souris conditionnelles n'ont pas de défauts cardio-vasculaires apparents (107). En contre partie, l'inactivation conditionnelle de Erk5 dans les cellules endothéliales, engendre un phénotype similaire à celui des souris Erk5^{-/-} (107). Ces résultats montrent donc que le phénotype cardio-vasculaire des souris Erk5^{-/-} découle des problèmes de vascularisation et d'angiogénèse, confirmant le rôle essentiel de Erk5 dans la survie des cellules endothéliales.

1.2.2 Les MAP kinases atypiques

1.2.2.1 Erk7/Erk8

1.2.2.1.1 Identification

Erk7 et son orthologue humain Erk8 ont été identifiés à la fin des années 90. Erk7 a été identifié suite au criblage d'une banque de cDNA de rat par la méthode de PCR utilisant des oligos dégénérés dérivés de la séquence du domaine kinase des MAP kinases (3). Par la suite, une sonde dérivée de la séquence de Erk7 a été utilisée pour cribler une banque de cDNA humain ce qui a permis d'identifier son orthologue Erk8 (4).

1.2.2.1.2 Structure et particularités

Erk7 possède 40% et Erk8 45% d'identité protéique avec le domaine kinase de Erk1. La boucle d'activation est composée du motif TXY, où X est un acide glutamique tout comme Erk1/2. Bien que ces deux protéines, respectivement de 546 et 544 acides aminés et de masse moléculaire d'environ 60 kDa, soient considérées comme des orthologues, Erk7 et Erk8 ne possèdent que 69% d'identité protéique entre-elles.

Erk7 et Erk8 sont considérées comme des MAP kinases atypiques. Ces deux kinases possèdent une extension C-terminale qui n'est pas présente chez les MAP kinases

classiques Erk1/2, Jnk et p38 et qui ne s'apparente pas à l'extension de Erk5. La fonction précise de cette extension n'est pas connue. Néanmoins, il a été montré que cette région est importante pour la localisation nucléaire et l'autophosphorylation de Erk7 (2, 3).

L'extrémité N-terminale de Erk7 régule également l'activité de cette kinase. En effet, tout comme la MAP kinase atypique Erk3, la stabilité protéique de Erk7 est régulée par la voie de l'ubiquitine-protéasome et implique la région N-terminale de la protéine (160).

1.2.2.1.3 La voie de signalisation Erk7/Erk8

La voie de signalisation Erk7/8 est encore aujourd'hui très peu caractérisée et aucune kinase activatrice s'apparentant aux MAPKKs n'a été identifiée jusqu'à maintenant. Contrairement aux MAP kinases classiques, la boucle d'activation de Erk7 est phosphorylée en absence de sérum et cette phosphorylation n'est pas modulée par les stimuli classiques des MAP kinases dont le sérum, le PMA (phorbol-12-myristate-13-acétate) ou le H₂O₂ (2, 3). De plus, cette phosphorylation semble uniquement attribuable à de l'auto-phosphorylation (2, 3).

Erk8 possède aussi la capacité de s'auto-phosphoryler *in vitro* et *in vivo* sur sa boucle d'activation (4, 150). Cependant, contrairement à Erk7, cette phosphorylation est modulée par certains stimuli des MAP kinases dont le sérum et le H₂O₂ (4, 150). De plus, l'expression d'une forme oncogénique ou constitutivement active de Src entraîne la phosphorylation de la boucle d'activation d'un mutant Erk8 catalytiquement inactif (4). Ainsi, la boucle d'activation de Erk8 peut également être phosphorylée en *trans* par une autre kinase. Il est peu probable que Src soit la kinase de la boucle d'activation de Erk8 puisque cette boucle se doit d'être phosphorylée sur une thréonine, en plus d'une tyrosine (motif TXY). La phosphorylation de ce motif par une kinase s'apparentant aux MAPKKs serait plus probable.

Jusqu'à présent aucun substrat *in vivo* de Erk7/8 n'ont été identifiés. Cependant, *in vitro* Erk7 démontre une activité kinase envers les substrats classiques des MAP kinases dont la MBP (Myelin Basic Protein), c-Fos et c-Myc (3).

1.2.2.1.4 Fonctions

1.2.2.1.4.1 Prolifération cellulaire

Erk7 semble réguler de manière négative la prolifération cellulaire. En effet, dans des conditions de surexpression, Erk7 inhibe de 50% la prolifération cellulaire des cellules de rein CV-1 (3). De manière intéressante, cet effet est indépendant de l'activité kinase mais dépendant de l'extension C-terminale, suggérant que certaines fonctions de Erk7 pourrait être kinase-indépendante.

1.2.2.1.4.2 Dégradation du récepteur à l'estrogène ER α

Erk7 régule de manière négative l'activité du récepteur aux estrogènes ER α (108). En effet, l'expression ectopique de Erk7 diminue le niveau d'expression du récepteur ER α en augmentant sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. À l'opposé, l'expression d'un mutant catalytiquement inactif, augmente le niveau d'expression de ER α ainsi que la réponse aux estrogènes. Le rôle de Erk7 dans la dégradation du récepteur ER α est dépendant de son activité kinase.

En accord avec ces observations, dans des lignées cellulaires de sein normales (MCF-10A) et cancéreuses (MCF7, MDA-MB-231), il y a une corrélation inverse entre l'expression de Erk7 et celle de ER α (108). De plus, dans des tissus de sein, la diminution de l'expression de Erk7 semble corrélée avec la progression tumorale (108).

1.2.2.1.4.3 Régulation négative de l'activité transcriptionnelle du récepteur aux glucocorticoïdes GR α

Erk8 régule de manière négative l'activité du récepteur aux glucocorticoïdes GR α (234). En effet, l'expression ectopique de Erk8 dans les cellules épithéliales de poumon diminue l'activité transcriptionnelle du récepteur GR α en réponse à la dexaméthasone. À l'opposé, l'inhibition de Erk8 par siRNA augmente l'activité transcriptionnelle du récepteur. Le rôle de Erk8 dans la régulation négative de l'activité du récepteur GR α est indépendant de son activité kinase. Les souris Erk8-déficientes n'ont pas encore été générées. Ceci permettrait de confirmer le rôle de Erk8 sur l'activité de ce récepteur *in vivo*.

1.2.2.2 Nlk

1.2.2.2.1 Identification

Nlk a été identifiée par une approche PCR utilisant des oligos dégénérés dérivés de la séquence des MAP kinases (29). Cette kinase est l'ortologue de la protéine Nemo identifiée chez la Drosophile (51), d'où le nom "Nemo-like kinase".

1.2.2.2.2 Structure et particularités

Nlk est une protéine de 515 acides aminés et de masse moléculaire de 60 kDa. Elle est considérée comme une MAP kinase atypique car elle possède des extensions en N- et C-terminal d'environ 100 acides aminés de part et d'autre du domaine kinase. L'extension N-terminale est riche en résidus alanine, glutamine, histidine et proline. Le rôle de ces extensions n'a pas encore été caractérisé.

Nlk possède une boucle d'activation composée du motif TQE. Tout comme Erk3 et Erk4, Nlk ne possède qu'un seul site phospho-accepteur dans la boucle d'activation. Ce motif ressemble davantage au motif TXE retrouvé sur Cdk1 (cyclin-dependent kinase 1) qu'au motif TXY retrouvé chez les MAP kinases. D'ailleurs, le domaine kinase de Nlk qui possède 42% d'identité protéique avec celui de Erk1, possède également 38% d'identité avec celui de Cdk1.

1.2.2.2.3 La voie de signalisation Nlk

La voie Nlk est activée par les stimuli de la voie Wnt (Wingless/Int factor), dont Wnt-1(137, 253) et Wnt-5a (121). L'activation par les Wnts implique les récepteurs Frizzled de la famille des GPCRs. Dans le cas de Wnt-5a, cette stimulation conduit à une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et l'activation de CaMKII (calmodulin-dependent kinase II) (121). La voie Nlk est également activée par certaines cytokines dont l'IL-6 et le G-CSF (153) ainsi que par le facteur de croissance TGF- β (transforming growth factor- β) (206).

Le module kinase Nlk n'est pas bien défini. L'activation de la MAPKKK TAK-1, conduit à l'activation de Nlk (123, 206, 253). Cependant, aucune kinase s'apparentant aux MAPKKs du module kinase classique n'a été identifiée jusqu'à maintenant. TAK-1 n'interagit pas directement avec Nlk, suggérant qu'une protéine en aval de TAK-1 serait impliquée dans l'activation de Nlk. Cette kinase pourrait s'avérer être HIPK2 (homeodomain-interacting protein kinase 2) (137). En effet, HIPK2 interagit avec Nlk *in vivo* et *in vitro* et stimule l'activité kinase de Nlk (137). De manière intéressante, HIPK2 phosphoryle Nlk mais ne semble pas phosphoryler la boucle d'activation. D'ailleurs, il n'y a aucune évidence que la boucle d'activation de Nlk soit phosphorylée *in vivo*. Néanmoins, la mutation de la Thr²⁸⁶ du motif TQE abolit l'auto-phosphorylation de Nlk *in vitro* suggérant que cette phosphorylation est importante pour l'activité catalytique ou que ce résidu est phosphorylé par Nlk (29).

Nlk ne phosphoryle pas les substrats génériques des MAP kinases et des Cdks (29). Par contre, les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) (122, 123), le proto oncogène c-Myb (137) ainsi que le facteur de transcription STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) (153) sont des substrats de Nlk *in vivo*.

1.2.2.2.4 Fonctions

1.2.2.2.4.1 Modulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine joue un rôle important dans plusieurs processus du développement embryonnaire dont la spécification de l'axe embryonnaire et la détermination du destin cellulaire (36). Selon les espèces, et en réponse aux facteurs Wnts, Nlk régule de manière positive ou de manière négative la voie Wnt/ β -caténine (121-123, 253). Chez *C. elegans*, l'activation de Nlk (LIT-1) par TAK-1 (MOM-4) entraîne la formation du complexe β -caténine-Nlk (WRM-1-LIT-1) et la phosphorylation du facteur de transcription POP-1 (223, 251, 272). POP-1 est un répresseur des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine s'apparentant aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF. La phosphorylation de POP-1 par Nlk (LIT-1) inhibe l'effet répresseur de ce facteur de

transcription et permet l'établissement de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Ainsi, chez *C. elegans*, Nlk est un régulateur positif de la voie Wnt/ β -caténine.

Tous comme chez *C. elegans*, l'activation de Nlk par TAK-1 entraîne l'inhibition des facteurs de transcription TCF/LEF chez le xénope et les mammifères (121-123, 253). Chez les organismes supérieurs, ces facteurs de transcription en complexe avec la β -caténine sont cependant des activateurs transcriptionnels. La phosphorylation des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF par Nlk inhibe la liaison de ce complexe avec l'ADN et ainsi, la transcription des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine. Ainsi, chez le xénope et les mammifères, Nlk est un régulateur négatif de la voie Wnt/ β -caténine.

1.2.2.2.4.2 Dégradation du proto-oncogène c-Myb

Nlk régule de manière négative l'activité transcriptionnelle du proto-oncogène c-Myb (137). c-Myb joue un rôle essentiel dans la prolifération des cellules hématopoïétiques immatures. En réponse à Wnt-1a, Nlk induit la dégradation de c-Myb par la voie de l'ubiquitine-protéasome (138).

La dégradation de c-Myb est dépendante de l'activité kinase de Nlk. En effet, l'expression d'une forme catalytiquement inactive de Nlk n'affecte pas le niveau d'expression de c-Myb. En accord avec cette observation, Nlk phosphoryle c-Myb *in vitro* et la mutation des résidus retrouvés dans un site consensus de phosphorylation pour Nlk abolit complètement la dégradation de c-Myb.

1.2.2.2.4.3 Développement

Le phénotype des souris Nlk^{-/-} varie en fonction du fond génétique (155). Dans un fond génétique C57BL/6, les souris Nlk^{-/-} meurent au cours du développement embryonnaire pendant le troisième trimestre de gestation. Dans un fond génétique 129/Sv, les souris meurent 4 à 6 semaines après la naissance et présentent un retard de croissance et une ataxie cérébrale prononcée. Dans un fond génétique mixte C57BL/6 et 129/Sv, les souris Nlk^{-/-} présentent un défaut de différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse. Elles présentent également un dérèglement du système hématopoïétique et une hypocellularité globale des cellules lymphocytaires. Toutefois le phénotype observé n'est

pas attribuable à un défaut au niveau du développement des lymphocytes. La transplantation de foie fœtal *Nlk*^{-/-} dans les souris immunodéficientes SCID (severe combined immuno-deficient) permet de reconstituer le compartiment lymphocytaire de la moelle osseuse, le thymus et la rate suggérant que *Nlk* n'est pas impliquée dans le développement des lymphocytes.

1.2.2.3 Erk3/Erk4

1.2.2.3.1 Identification

Erk3 a été identifiée au début des années 90 par criblage d'une banque de cDNA de rat à l'aide d'une sonde dérivée de Erk1 (27). Initialement, Erk3 a été caractérisée comme une protéine de 543 acides aminés et de masse moléculaire de 63kDa (27). Par la suite, l'identification du cDNA humain, a révélé que la protéine humaine possédait une extension C-terminale de 178 acides aminés par rapport à la protéine de rat (184, 309). Au début des années 2000, le cDNA de Erk3 chez la souris a été isolé dans notre laboratoire (277). Tout comme la forme humaine, Erk3 correspondait à une protéine plus longue. La caractérisation du gène Erk3 de souris ainsi que le re-séquençage du cDNA de rat a permis de confirmer que Erk3 est en fait le produit d'un seul gène dont l'expression engendre une protéine unique de 720 acides aminés chez la souris et de 721 chez l'humain et de masse moléculaire de 100 kDa (276, 277).

Le cDNA de Erk4 a été isolé il y a plus d'une dizaine d'années, chez l'humain (93) et chez le rat (86), à l'aide d'une sonde dérivée de Erk1. À l'origine, la forme humaine a été caractérisée comme étant une protéine de 557 acides aminés et de masse moléculaire de 63 kDa. Cette kinase fut initialement nommée p63^{mapk}. Dans le cadre de ma maîtrise, en comparant la séquence protéique de la forme humaine avec celle de la souris, nous avons constaté une divergence au niveau de la queue C-terminale entre les deux protéines. Cette différence faisait en sorte que la protéine de souris était composée de 587 acides aminés au lieu de 557. Suite au re-séquençage du cDNA humain, nous avons pu confirmer que la forme humaine est également constituée de 587 acides aminés (5).

1.2.2.3.2 Caractérisation du gène *Mapk6* et *Mapk4*

L'existence de plusieurs gènes apparentés au gène *Mapk6* (Erk3) a été suggérée suite à des expériences de Southern-Blot, chez l'humain et chez le rat, montrant la présence de plusieurs bandes d'ADN génomique s'hybridant avec une sonde dérivée du cDNA de Erk3 (184) (27). Cependant, ces résultats étaient différents de ceux obtenus par hybridation *in situ*, utilisant le cDNA pleine longueur qui localisait le gène *Mapk6* à un seul locus situé sur le chromosome humain 15q21 (184). De plus, chez la souris une seule bande correspondant au gène *Mapk6* avait été détectée par Southern-Blot (277). Par la suite, une analyse plus détaillée montra que Erk3 est effectivement le produit d'un seul gène et que la présence des différentes bandes d'ADN génomique retrouvées par Southern-Blot pouvait s'expliquer par la présence de plusieurs pseudogènes, dont un chez la souris et six chez l'humain (276). Chez la souris le gène *Mapk6* est localisé sur le chromosome 9 et chez l'humain sur le chromosome 15q21 (277).

La caractérisation du gène *Mapk4* (Erk4) se résume à l'analyse effectuée en comparant l'alignement de la séquence du cDNA avec la séquence d'ADN génomique retrouvée dans les banques de données. Tout comme le gène *Mapk6*, le gène *Mapk4* est situé sur un seul locus. Ce locus se trouve sur le chromosome 18 chez la souris et sur le chromosome 18q21 chez l'humain.

Les gènes *Mapk6* et *Mapk4* ont une organisation génomique très similaire (FIG. 8.). Ces deux gènes sont composés de 6 exons. Le premier exon correspond à une région non codante (3'UTR) et il est situé très en amont du deuxième exon contenant le site d'initiation de la traduction. Les exons 2,3 4 et 5 codent pour le domaine kinase. L'exon 6 code pour l'extension C-terminale de ces deux protéines et contient également une région non-codante (5'UTR). L'organisation exonique, en ce qui a trait à la répartition des régions codantes pour les différents sous domaines du domaine kinase, est conservée entre les deux gènes (FIG. 9.). Ainsi, la grande similitude entre ces deux gènes suggère fortement qu'ils sont le résultat de la duplication d'un gène ancestral commun (276). De plus, contrairement aux MAP kinases classiques, ces deux gènes ne sont présents que chez les organismes supérieurs. Ils n'ont aucun orthologue chez les invertébrés ou chez les plantes (276).

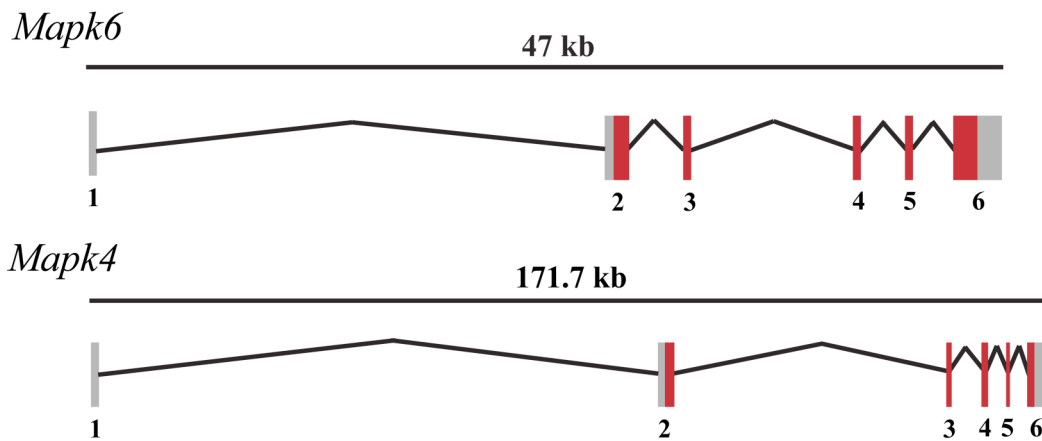


FIG. 8. Organisation génomique de gène Mapk6 et Mapk4 humain.

Les gènes *Mapk6* et *Mapk4* sont constitués de 6 exons. Les régions codantes sont représentées en rouge. Adapté de (182, 183).

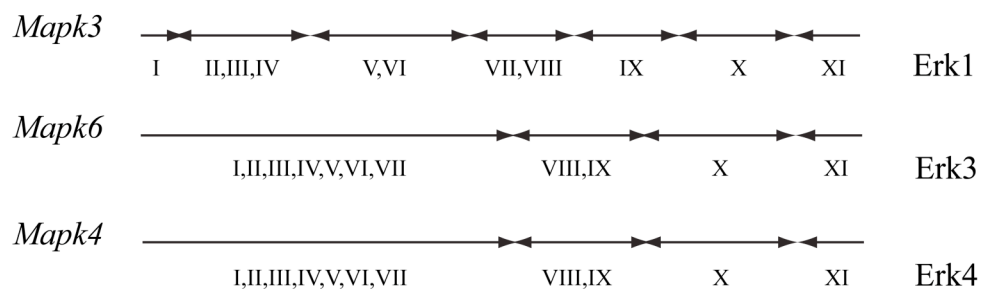


FIG. 9. Organisation exonique des régions codantes pour les différents sous-domaines du domaine kinase.

Les exons sont représentés par des flèches. Les différents sous-domaines du domaine kinase sont numérotés en chiffres romains. Adapté de (276)

1.2.2.3.3 Structure et particularités

Erk3 et Erk4 ont une structure protéique très similaire (FIG. 10.). Ces deux kinases possèdent 73% d'identité protéique au niveau de leur domaine kinase. Par rapport à Erk1, cette homologie est de 50% pour Erk3 et 42% pour Erk4. Cependant, Erk3 et Erk4 sont considérées comme des MAP kinases atypiques. Tout d'abord, la boucle d'activation de ces deux kinases est composée du motif SEG au lieu du motif TXY, très conservé chez les MAP kinases classiques. Deuxièmement, Erk3 et Erk4 possèdent une longue extension en C-terminal du domaine kinase qui n'est pas présente chez les MAP kinases classiques.

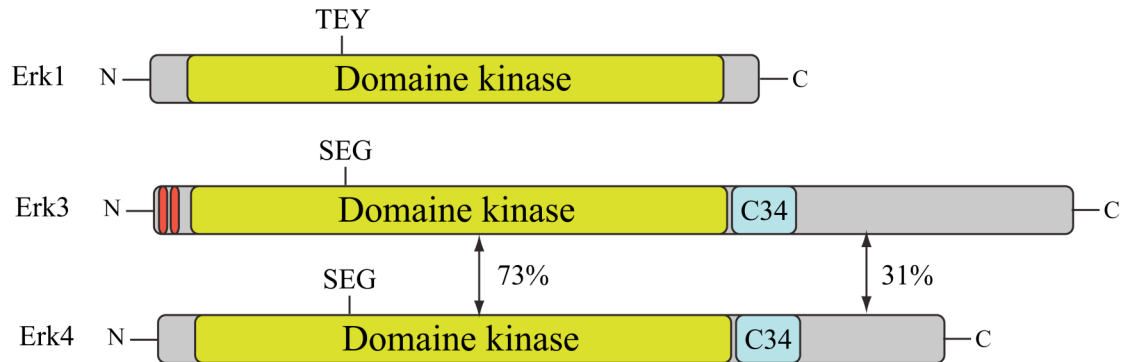


FIG. 10. Structure et identité protéique des MAP kinases atypiques Erk3 et Erk4.

Erk3 et Erk4 possèdent 73% d'identité protéique à l'intérieur du domaine kinase (orange) et 31% au niveau de leur extension C-terminale. Le début de l'extension C-terminale (C34, turquoise) est une région très conservée entre Erk3 et Erk4. La boucle d'activation est composée du motif SEG. Erk3 possède deux régions, NDR1 et NDR2 (vert), lui conférant son instabilité protéique.

Au niveau de la région C-terminale, les premiers 34 acides aminés de Erk3 et Erk4 sont conservés alors que l'identité protéique est de 31% pour le reste de l'extension C-terminale. La fonction précise de cette extension n'est pas connue à ce jour. Cependant, la caractérisation de l'extension C-terminale de Erk3 a permis de révéler que cette région joue un rôle dans sa localisation subcellulaire. En effet, des travaux conduits dans notre laboratoire ont montré que la délétion de la région C-terminale favorise l'accumulation nucléaire de Erk3 et que cette région est impliquée dans le transport nucléo-cytoplasmique de la protéine via un mécanisme de transport actif impliquant le récepteur d'export nucléaire CRM1 (chromosome region maintenance 1) (134). De plus, une autre étude a montré que les derniers 120 acides aminés de l'extrémité C-terminale de Erk3 sont impliqués dans la localisation de Erk3 au Golgi et au ERGIC (endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment) (19). Pour ce qui est de Erk4, sa localisation subcellulaire semble également être régulée par un mécanisme de transport actif puisque l'ajout de la leptomycine B, un inhibiteur de CRM-1, entraîne une accumulation nucléaire de la protéine (5). L'impact de l'extension C-terminale sur la localisation de Erk4 n'est pas connue.

Au niveau de la séquence protéique, Erk3 et Erk4 possèdent des domaines d'interaction s'apparentant au domaine CD et ED des MAP kinases classiques. Cependant, jusqu'à présent ces domaines ne semblent pas contribuer à l'interaction entre Erk3/Erk4 et

leurs partenaires. En contre partie, il a été montré que l'interaction entre Erk3 et deux de ses partenaires, soit la cycline D3 (258) et la phosphatase Cdc14 (102) semble dépendre de l'extension C-terminale de Erk3. De plus, il a été montré que l'interaction entre Erk3/Erk4 et leur substrat MK5 ne requiert pas le domaine CD mais plutôt un motif composé des acides aminés F-R-I-E-D-E situé en aval du motif CD (6). Ce motif se retrouve entre les acides aminés 330 et 340 dans la région précédemment identifiée comme étant importante pour l'interaction entre Erk3/Erk4 et MK5 (5, 139, 239, 244).

Au niveau de la région N-terminale, Erk3 possède 2 régions, NDR1 et NDR2 (N-terminal degradation region), qui sont impliquées dans l'instabilité et la dégradation de la protéine par le système ubiquitine-protéasome (60). De plus, l'ubiquitination de Erk3 se fait non pas sur les résidus lysines internes à la protéine, mais bien sur l'amine du premier résidu de l'extrémité N-terminale (59). Contrairement à Erk3, dont la demi-vie est d'environ 30-45 minutes, Erk4 est une protéine stable (5), malgré le fait que la séquence des régions NDR1 et NDR2 soit assez bien conservée entre ces deux kinases.

1.2.2.3.4 Profil d'expression

Erk3 est une protéine ubiquitaire. L'ARNm est fortement exprimé dans le système nerveux, les muscles squelettiques et l'intestin (184, 276). Lors du développement embryonnaire chez la souris, l'expression du messager augmente considérablement aux jours 9 et 11, puis diminue graduellement jusqu'à la naissance (276). L'expression de l'ARNm augmente aussi lors de la différenciation des cellules de carcinome embryonnaire P19 vers une lignée neuronale ou musculaire (27).

Chez la souris, tout comme Erk3, l'ARNm de Erk4 est exprimé au cours du développement embryonnaire dans le cerveau, le poumon et le rein (139). Chez l'humain, l'ARNm est fortement exprimé dans le cerveau et le cœur (93).

1.2.2.3.5 La voie de signalisation Erk3/Erk4

La voie Erk3/Erk4 est encore aujourd'hui très peu caractérisée. Aucun stimuli ou kinases capables d'activer Erk3 et Erk4 n'ont été identifiés jusqu'à maintenant. Néanmoins, la caractérisation de Erk3 a permis de révéler que la boucle d'activation de cette kinase est

phosphorylée *in vivo* (48, 49, 60). De plus, bien qu'elle n'ait pas été caractérisée davantage, une kinase capable de phosphoryler la S¹⁸⁹ de la boucle d'activation de Erk3 a été partiellement purifiée (48, 49), ce qui supporte l'existence d'une Erk3 kinase. De manière intéressante, la boucle d'activation de Erk3 est phosphorylée en absence de stimuli (48), suggérant que Erk3 pourrait être régulée de manière différente des MAP kinases classiques. Au cours de mon doctorat, nous avons caractérisé le mécanisme d'activation de Erk3 et de Erk4. Ces résultats seront présentés au chapitre II.

La présence d'une activité kinase a d'abord été démontrée *in vitro* par l'auto-phosphorylation d'une forme recombinante de Erk3 (48). Plusieurs substrats classiques des MAP kinases dont la MBP, MAP2 (Microtubule associated protein), c-Jun, MyoD et c-Elk ont aussi été testés *in vitro*, mais aucun ne s'est avéré être un substrat de Erk3. Ainsi, cette sous-famille de kinase semble avoir une spécificité de substrat plus stringente que celle des MAP kinases classiques. Il a fallu attendre plusieurs années avant que MK5, le premier substrat de Erk3 et Erk4, soit identifié (5, 139, 239, 244).

1.2.2.3.6 La MAPKAP kinase MK5/PRAK

MK5/PRAK est une sérine/thréonine kinase de la famille des MAPKAP kinases qui comprend également RSK1-4, MNK1/2, MSK1/2 et MK2/3, des effecteurs bien connus des MAP kinases classiques (228) (FIG.11.). Parmi les MAPKAP kinases, MK5 s'apparente davantage à MK2 et MK3, deux substrats spécifiques à p38, avec qui elle partage environ 40% d'identité protéique (85, 228). Tout comme MK2 et MK3, la boucle d'activation de MK5 est composée d'un résidu thréonine, soit la T¹⁸², suivie d'un résidu proline. MK5 possède également un motif NLS et un motif NES (nuclear export signal) fonctionnel (243).

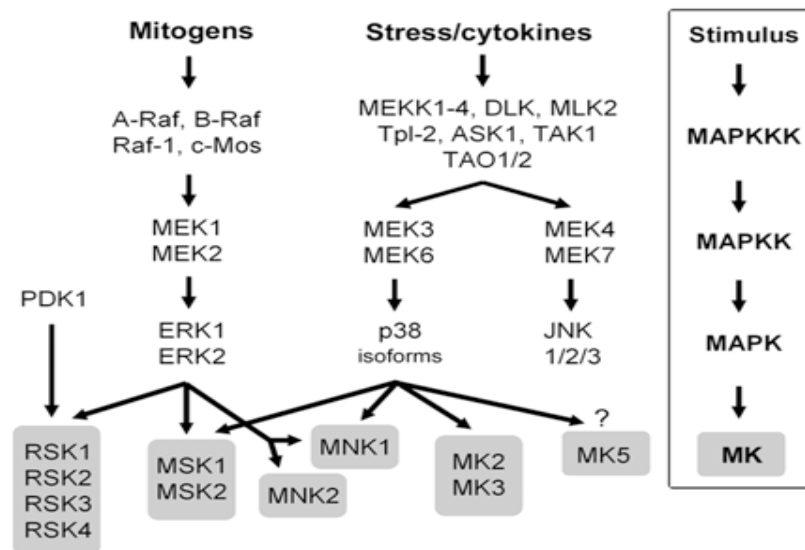


FIG. 11. Activation des MAPKAP kinases par les MAP kinases classiques.

Tiré de (228)

MK5 est un substrat de p38 *in vitro* et *in vivo* dans des conditions de surexpression et en réponse à certains stress (198, 199, 201, 243). Cependant, quelques résultats laissent suggérer que MK5 n'est pas un substrat physiologique de p38. Premièrement, MK5 endogène n'est pas activée de manière significative par les stimuli classiques de p38 dont l'arsenite et le sorbitol (250). Deuxièmement, MK5 n'est pas impliquée dans la réponse inflammatoire induite par le LPS, un activateur puissant de la voie p38 (250). En effet, les souris MK5^{-/-} ne sont pas résistantes à un choc endotoxique causé par le LPS et ne présente pas de défaut de production de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF α , IL-1 et IL-6. Troisièmement, aucune interaction entre p38 et MK5 endogène n'a pu être détectée (244).

En contrepartie, MK5 est un substrat de Erk3/4 *in vitro* et *in vivo* dans des conditions de surexpression mais également dans des conditions physiologiques (5, 139, 244). En effet, l'activité kinase de MK5 endogène est diminuée dans les MEFs Erk3^{-/-} (244) et lorsque l'expression de Erk3 et Erk4 est abolie par siRNA dans les cellules Hela (5). De plus, l'interaction entre Erk3/Erk4 et MK5 a été confirmée au niveau endogène (139, 244).

L'activation de MK5 par Erk3/Erk4 nécessite la phosphorylation de la T¹⁸² de la boucle d'activation de MK5 (5, 139, 244). Cependant et contrairement à Erk4, Erk3 peut également activer MK5 de manière kinase indépendante en agissant à titre de "scaffold"

(239). Dans ces conditions, l'activation de MK5 serait le résultat de son auto-phosphorylation sur sa boucle d'activation.

Erk3 et Erk4 régulent également la localisation subcellulaire de MK5 (5, 139, 239, 244). Lorsque exprimées seules, MK5 et Erk3 sont majoritairement nucléaires et Erk4 majoritairement cytoplasmique. La co-expression de Erk3 et MK5 ou Erk4 et MK5 entraîne la relocalisation de MK5 au cytoplasme. De manière intéressante, la relocalisation du complexe Erk3/Erk4-MK5 est indépendante de l'activité kinase de l'une ou l'autre de ces kinases.

L'impact fonctionnel de l'interaction entre Erk3/4 et MK5 n'a pas encore été élucidé. D'ailleurs la fonction de MK5 n'est pas connue. Cependant, certaines évidences laissent suggérer que MK5 pourrait être impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire (87, 156, 261) ainsi que dans la suppression de tumeurs (259). L'implication de Erk3/Erk4 dans ces différentes fonctions putatives n'a pas été adressée. De plus, bien que les souris MK5^{-/-} ne présentent pas de phénotype apparent dans un fond génétique mixte (250), l'inactivation de MK5 dans un fond génétique C57BL/6 entraîne un phénotype impénétrant (50%) de létalité au jour E11.5 (239) suggérant que MK5 pourrait également jouer un rôle dans le développement embryonnaire.

1.2.2.3.7 Fonctions

1.2.2.3.7.1 Prolifération cellulaire

Plusieurs observations laissent envisager que Erk3 pourrait être impliquée dans la régulation du cycle cellulaire dans certaines conditions. Certaines évidences suggèrent que Erk3 serait un régulateur négatif de la transition G1/S. Tout d'abord, l'expression d'une forme non-dégradable de Erk3 induit l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G1/S (60). De manière intéressante, cet effet est indépendant de l'activité kinase, mais dépend de l'extension C-terminale (60, 134). Ainsi, certaines fonctions de Erk3 pourraient être kinase-indépendante. Deuxièmement, l'inhibition de la prolifération dans les cellules de lymphome Raji et les cellules de carcinome squameux, par les gangliosides et le collagène respectivement, coïncide avec une augmentation de l'expression de l'ARNm de Erk3 (62,

149). Troisièmement, bien que l'impact de cette interaction ne soit pas connu, Erk3 a été identifiée comme un partenaire de la cycline D3 (258).

Erk3 pourrait également avoir un rôle à jouer dans la transition G2/M et/ou la progression en mitose. Des travaux conduits dans notre laboratoire ont montré que l'extrémité C-terminale de Erk3 est hyper-phosphorylée en début de mitose et que cette phosphorylation est assurée, du moins en partie, par Cdk1 (266). Le complexe Cdk1/cycline B est un important régulateur de l'entrée des cellules en mitose (167). De manière intéressante, cet état de phosphorylation ne semble pas affecter la phosphorylation de la boucle d'activation ni l'activité kinase intrinsèque de Erk3. Ainsi, dans certaines conditions, l'activité de Erk3 pourrait être régulée de manière C-terminale dépendante. De plus, il a été montré que Cdc14 déphosphoryle l'extrémité C-terminale de Erk3 *in vitro* (102) et *in vivo* dans des cellules en mitose lorsque surexprimée (266). La phosphatase Cdc14 (cell cycle division) est un important régulateur de la division cellulaire. Cette phosphatase joue un rôle dans la séparation des chromosomes et la cytokinèse (54, 257). De manière intéressante, la déphosphorylation de Erk3 coïncide avec la sortie de la mitose (266).

1.2.2.3.7.2 Différenciation cellulaire

Certaines observations suggèrent que Erk3 pourrait être impliquée dans la différenciation cellulaire. Tout d'abord, dans différents modèles de différenciation cellulaire, l'expression de Erk3 est régulée au cours de la différenciation. En effet, l'expression de l'ARNm de Erk3 augmente au cours de la différenciation des cellules de carcinome P19 en cellules neuronales ou musculaires (27). De plus, l'expression de la protéine augmente au cours de la différenciation des cellules PC12 en cellules neuronales sympathiques ainsi que lors de la différenciation des myoblastes C2C12 en cellules de muscles (60). Deuxièmement, tel que mentionné l'expression d'une forme stable de Erk3 inhibe l'entrée des cellules en phase S (60). Ainsi, il est possible que Erk3 participe à la sortie du cycle cellulaire, sortie nécessaire aux processus de différenciation cellulaire. Troisièmement, l'interaction entre Erk3 et la cycline D3 (258) pourrait également suggérer un rôle de Erk3 dans la différenciation cellulaire. En effet, en plus de son rôle dans la progression de la phase G1/S, la cycline D3 est impliquée dans la différenciation des

cellules de muscle où elle joue un rôle important dans la sortie du cycle cellulaire (41). D'ailleurs, son expression augmente au cours de la différenciation des cellules musculaires, tout comme Erk3 (41, 147).

1.2.2.3.7.3 Suppression de tumeurs

Certaines observations suggèrent que Erk3 et/ou Erk4 pourraient jouer un rôle dans la suppression des tumeurs. Tout d'abord, Erk3 semble posséder des propriétés anti-prolifératives (section 1.4.6.1). Ensuite, l'augmentation de l'expression de Erk3 inhibe non seulement la prolifération mais également la migration et l'invasion des cellules de carcinomes squameux (62). Finalement, MK5, a récemment été impliquée dans la suppression de tumeur et la sénescence induite par l'oncogène Ras (259). En effet, les souris MK5^{-/-} traité au DMBA (Di-méthyl-benzanthracène), un agent qui induit des tumeurs de la peau qui dans 90% des cas se traduit par une activation de Ha-Ras, développent des tumeurs plus précocement et ont un taux de survie beaucoup moins élevé que les souris de type sauvage. En accord avec ces résultats, MK5 est requise pour la sénescence induite par Ha-Ras^{V12} dans les fibroblastes de souris et humains et son inactivation facilite leur transformation. Finalement, MK5 phosphoryle directement le suppresseur de tumeur p53 sur la S³⁷ ce qui augmente son activité transcriptionnelle. Bien qu'il a été suggéré que le rôle de MK5 dans la sénescence dépende de l'activation de la voie p38, l'implication de Erk3 et Erk4 dans l'activation de MK5 n'a pas été investigué dans cette étude.

Curieusement, l'expression d'une forme oncogénique de B-Raf (B-Raf^{V600E}) induit une augmentation de l'expression de Erk3 au niveau du transcript et de la protéine (114). Cependant, la xénogreffe des cellules tumorales A375 dont l'expression de Erk3 est inhibée par shRNA n'altère ni la taille ni le nombre de tumeurs. De plus, l'analyse histologique des tumeurs par immuno-histochimie n'a révélé aucune différence significative au niveau de la prolifération, de l'apoptose et de l'angiogénèse entre les tumeurs issues des souris de type sauvage et celles où l'expression de Erk3 a été inhibée. Le rôle de Erk3 dans la tumorigénèse reste à clarifier.

1.2.2.3.7.4 Sécrétion d'insuline

Certaines données suggèrent que Erk3 pourrait avoir un rôle à jouer dans la sécrétion d'insuline. Tout d'abord, une augmentation du niveau de l'ARNm de Erk3 a été observé dans les îlots pancréatiques de rats traités à la prolactine (24) ou isolés de femelles gestante au jour E19 (12). La prolactine joue un rôle important lors de la reproduction, principalement en ce qui a trait à la lactation (18). *In vitro* et *in vivo* cette hormone joue également un rôle dans la sécrétion d'insuline et le métabolisme du glucose (256, 282). Deuxièmement, l'inhibition de Erk3 à l'aide d'oligo antisens abolit la sécrétion d'insuline. Cet effet a été observé dans les îlots de Langerhans dans des conditions où la sécrétion d'insuline est induite par de fortes doses de glucose ainsi que dans les cellules RINm5F, un autre modèle utilisé pour étudier la sécrétion d'insuline, mais dans des conditions où la sécrétion est induite par le PMA (12).

1.2.2.3.7.5 Développement

Les souris Erk3^{-/-} ont été générées dans notre laboratoire (151). Ces souris meurent dans les premières 24 h suivant la naissance. La cause exacte entraînant la mort n'a pas été identifiée. Cependant, les souris Erk3^{-/-} présentent un retard de croissance intra-utérin qui se traduit par une diminution de 10-15% du poids de l'embryon et de 25-40% du poids des organes fœtaux. Les souris Erk3^{-/-} présentent également une détresse respiratoire sévère. L'analyse des poumons Erk3^{-/-} a révélé que l'inactivation de Erk3 entraîne un retard de maturation du poumon qui se traduit par une diminution de l'espace sacculaire et une augmentation du contenu en glycogène dans les pneumocytes de types II. Le glycogène est normalement utilisé pour la production de surfactant, ce qui permet de réduire la tension alvéolaire à l'interface air-liquide (221). De manière intéressante, l'injection de dexamétasone afin d'induire la maturation des poumons Erk3^{-/-} ne corrige pas le phénotype de létalité néo-natale, suggérant que le problème de maturation à lui seul n'est pas suffisant pour entraîner la mort.

1.3 Objectifs de cette thèse

1.3.1 Objectif général

Parmi les MAP kinases, Erk4 est encore aujourd'hui la MAP kinase la moins caractérisée. L'objectif général de mes recherches était de caractériser le mécanisme d'activation de cette MAP kinase atypique et d'identifier ses fonctions physiologiques.

1.3.2 Objectifs spécifiques

1.3.2.1 Étudier le mécanisme d'activation de Erk4

Afin d'étudier le mécanisme d'activation de Erk4, mon premier objectif était de valider que la boucle d'activation de Erk4 était phosphorylée *in vivo* et que cette phosphorylation était dépendante d'une autre kinase. Mon deuxième objectif était d'identifier les conditions modulant la phosphorylation de la boucle d'activation. Enfin, mon troisième objectif était de caractériser l'impact de cette phosphorylation sur la régulation de l'activité de MK5.

1.3.2.2 Caractériser la fonction physiologique de Erk4

Afin d'identifier la fonction physiologique de Erk4, mon premier objectif était de générer un modèle animal dont l'expression du gène *Mapk4*(Erk4) était abolie. Mon deuxième objectif était de caractériser le phénotype des souris déficientes pour Erk4. Mon troisième objectif était de déterminer si l'absence de phénotype pouvait s'expliquer par un mécanisme de compensation assuré par Erk3, le gène paralogue de Erk4. Enfin, mon quatrième objectif était de caractériser l'implication de Erk4 dans les phénotypes associés à la perte de Erk3 et d'étudier la redondance entre Erk3 et Erk4 *in vivo*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abe, J., M. Kusuvara, R. J. Ulevitch, B. C. Berk, and J. D. Lee.** 1996. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* **271**:16586-90.
2. **Abe, M. K., K. T. Kahle, M. P. Saelzler, K. Orth, J. E. Dixon, and M. R. Rosner.** 2001. ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J Biol Chem* **276**:21272-9.
3. **Abe, M. K., W. L. Kuo, M. B. Hershenson, and M. R. Rosner.** 1999. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol* **19**:1301-12.
4. **Abe, M. K., M. P. Saelzler, R. Espinosa, 3rd, K. T. Kahle, M. B. Hershenson, M. M. Le Beau, and M. R. Rosner.** 2002. ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* **277**:16733-43.
5. **Aberg, E., M. Perander, B. Johansen, C. Julien, S. Meloche, S. M. Keyse, and O. M. Seternes.** 2006. Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* **281**:35499-510.
6. **Aberg, E., K. M. Torgersen, B. Johansen, S. M. Keyse, M. Perander, and O. M. Seternes.** 2009. Docking of PRAK/MK5 to the atypical MAPKs ERK3 and ERK4 defines a novel MAPK interaction motif. *J Biol Chem* **284**:19392-401.
7. **Adams, R. H., A. Porras, G. Alonso, M. Jones, K. Vintersten, S. Panelli, A. Valladares, L. Perez, R. Klein, and A. R. Nebreda.** 2000. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell* **6**:109-16.
8. **Ahn, N. G., R. Seger, and E. G. Krebs.** 1992. The mitogen-activated protein kinase activator. *Curr Opin Cell Biol* **4**:992-9.
9. **Akella, R., T. M. Moon, and E. J. Goldsmith.** 2008. Unique MAP Kinase binding sites. *Biochim Biophys Acta* **1784**:48-55.
10. **Albanese, C., J. Johnson, G. Watanabe, N. Eklund, D. Vu, A. Arnold, and R. G. Pestell.** 1995. Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* **270**:23589-97.
11. **Allen, M., L. Svensson, M. Roach, J. Hambor, J. McNeish, and C. A. Gabel.** 2000. Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells. *J Exp Med* **191**:859-70.
12. **Anhe, G. F., A. S. Torrao, T. C. Nogueira, L. C. Caperuto, M. E. Amaral, M. C. Medina, A. K. Azevedo-Martins, A. R. Carpinelli, C. R. Carvalho, R. Curi, A. C. Boschero, and S. Bordin.** 2006. ERK3 associates with MAP2 and is involved in glucose-induced insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* **251**:33-41.
13. **Arthur, J. S.** 2008. MSK activation and physiological roles. *Front Biosci* **13**:5866-79.
14. **Atkins, C. M., J. C. Selcher, J. J. Petraitis, J. M. Trzaskos, and J. D. Sweatt.** 1998. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* **1**:602-9.

15. **Bagrodia, S., B. Derijard, R. J. Davis, and R. A. Cerione.** 1995. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **270**:27995-8.
16. **Beardmore, V. A., H. J. Hinton, C. Eftychi, M. Apostolaki, M. Armaka, J. Darragh, J. McIlrath, J. M. Carr, L. J. Armit, C. Clacher, L. Malone, G. Kollias, and J. S. Arthur.** 2005. Generation and characterization of p38beta (MAPK11) gene-targeted mice. *Mol Cell Biol* **25**:10454-64.
17. **Behrens, A., M. Sibilis, and E. F. Wagner.** 1999. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* **21**:326-9.
18. **Ben-Jonathan, N., E. R. Hugo, T. D. Brandebourg, and C. R. LaPensee.** 2006. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab* **17**:110-6.
19. **Bind, E., Y. Kleyner, D. Skowronska-Krawczyk, E. Bien, B. D. Dynlacht, and I. Sanchez.** 2004. A novel mechanism for mitogen-activated protein kinase localization. *Mol Biol Cell* **15**:4457-66.
20. **Blank, J. L., P. Gerwins, E. M. Elliott, S. Sather, and G. L. Johnson.** 1996. Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase. *J Biol Chem* **271**:5361-8.
21. **Blomberg, I., and I. Hoffmann.** 1999. Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol* **19**:6183-94.
22. **Bogoyevitch, M. A., C. J. Marshall, and P. H. Sugden.** 1995. Hypertrophic agonists stimulate the activities of the protein kinases c-Raf and A-Raf in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem* **270**:26303-10.
23. **Bollig, F., R. Winzen, M. Gaestel, S. Kostka, K. Resch, and H. Holtmann.** 2003. Affinity purification of ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-induced mRNA stabilization. *Biochem Biophys Res Commun* **301**:665-70.
24. **Bordin, S., M. E. Amaral, G. F. Anhe, V. Delghingaro-Augusto, D. A. Cunha, J. E. Nicoletti-Carvalho, and A. C. Boschero.** 2004. Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. *Mol Cell Endocrinol* **220**:41-50.
25. **Bost, F., M. Aouadi, L. Caron, P. Even, N. Belmonte, M. Prot, C. Dani, P. Hofman, G. Pages, J. Pouyssegur, Y. Le Marchand-Brustel, and B. Binetruy.** 2005. The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* **54**:402-11.
26. **Bost, F., L. Caron, I. Marchetti, C. Dani, Y. Le Marchand-Brustel, and B. Binetruy.** 2002. Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochem J* **361**:621-7.
27. **Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb, and G. D. Yancopoulos.** 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**:663-75.
28. **Boulton, T. G., G. D. Yancopoulos, J. S. Gregory, C. Slaughter, C. Moomaw, J. Hsu, and M. H. Cobb.** 1990. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* **249**:64-7.

29. **Brott, B. K., B. A. Pinsky, and R. L. Erikson.** 1998. Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:963-8.
30. **Brunet, A., G. Pages, and J. Pouyssegur.** 1994. Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene* **9**:3379-87.
31. **Bulavin, D. V., S. A. Amundson, and A. J. Fornace.** 2002. p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony. *Curr Opin Genet Dev* **12**:92-7.
32. **Bulavin, D. V., Y. Higashimoto, I. J. Popoff, W. A. Gaarde, V. Basrur, O. Potapova, E. Appella, and A. J. Fornace, Jr.** 2001. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* **411**:102-7.
33. **Bulavin, D. V., C. Phillips, B. Nannenga, O. Timofeev, L. A. Donehower, C. W. Anderson, E. Appella, and A. J. Fornace, Jr.** 2004. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet* **36**:343-50.
34. **Bulavin, D. V., S. Saito, M. C. Hollander, K. Sakaguchi, C. W. Anderson, E. Appella, and A. J. Fornace, Jr.** 1999. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* **18**:6845-54.
35. **Buschbeck, M., and A. Ullrich.** 2005. The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem* **280**:2659-67.
36. **Cadigan, K. M., and R. Nusse.** 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* **11**:3286-305.
37. **Canagarajah, B. J., A. Khokhlatchev, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**:859-69.
38. **Carriere, A., M. Cargnello, L. A. Julien, H. Gao, E. Bonneil, P. Thibault, and P. P. Roux.** 2008. Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr Biol* **18**:1269-77.
39. **Casamayor, A., N. A. Morrice, and D. R. Alessi.** 1999. Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochem J* **342** (Pt 2):287-92.
40. **Casanovas, O., F. Miro, J. M. Estanyol, E. Itarte, N. Agell, and O. Bachs.** 2000. Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner. *J Biol Chem* **275**:35091-7.
41. **Cenciarelli, C., F. De Santa, P. L. Puri, E. Mattei, L. Ricci, F. Bucci, A. Felsani, and M. Caruso.** 1999. Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation. *Mol Cell Biol* **19**:5203-17.
42. **Chang, C. I., B. E. Xu, R. Akella, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 2002. Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b. *Mol Cell* **9**:1241-9.
43. **Chang, L., and M. Karin.** 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40.
44. **Chao, T. H., M. Hayashi, R. I. Tapping, Y. Kato, and J. D. Lee.** 1999. MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway. *J Biol Chem* **274**:36035-8.

45. **Chen, C. Y., and A. B. Shyu.** 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* **20**:465-70.
46. **Chen, R. H., C. Abate, and J. Blenis.** 1993. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:10952-6.
47. **Chen, Z., T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M. H. Cobb.** 2001. MAP kinases. *Chem Rev* **101**:2449-76.
48. **Cheng, M., T. G. Boulton, and M. H. Cobb.** 1996. ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem* **271**:8951-8.
49. **Cheng, M., E. Zhen, M. J. Robinson, D. Ebert, E. Goldsmith, and M. H. Cobb.** 1996. Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3. *J Biol Chem* **271**:12057-62.
50. **Chiariello, M., M. J. Marinissen, and J. S. Gutkind.** 2000. Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncoprotein to the c-jun promoter and to cellular transformation. *Mol Cell Biol* **20**:1747-58.
51. **Choi, K. W., and S. Benzer.** 1994. Rotation of photoreceptor clusters in the developing *Drosophila* eye requires the nemo gene. *Cell* **78**:125-36.
52. **Chu, Y., P. A. Soltski, R. Khosravi-Far, C. J. Der, and K. Kelly.** 1996. The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem* **271**:6497-501.
53. **Chung, J. Y., Y. C. Park, H. Ye, and H. Wu.** 2002. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* **115**:679-88.
54. **Clifford, D. M., C. T. Chen, R. H. Roberts, A. Feoktistova, B. A. Wolfe, J. S. Chen, D. McCollum, and K. L. Gould.** 2008. The role of Cdc14 phosphatases in the control of cell division. *Biochem Soc Trans* **36**:436-8.
55. **Cohen, P.** 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* **25**:596-601.
56. **Cooper, J. A., D. F. Bowen-Pope, E. Raines, R. Ross, and T. Hunter.** 1982. Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell* **31**:263-73.
57. **Coso, O. A., M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki, and J. S. Gutkind.** 1995. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**:1137-46.
58. **Coulombe, P., and S. Meloche.** 2007. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**:1376-87.
59. **Coulombe, P., G. Rodier, E. Bonneil, P. Thibault, and S. Meloche.** 2004. N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* **24**:6140-50.
60. **Coulombe, P., G. Rodier, S. Pelletier, J. Pellerin, and S. Meloche.** 2003. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* **23**:4542-58.
61. **Crews, C. M., A. Alessandrini, and R. L. Erikson.** 1992. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**:478-80.

62. **Crowe, D. L.** 2004. Induction of p97MAPK expression regulates collagen mediated inhibition of proliferation and migration in human squamous cell carcinoma lines. *Int J Oncol* **24**:1159-63.
63. **Cundiff, P., L. Liu, Y. Wang, J. Zou, Y. W. Pan, G. Abel, X. Duan, G. L. Ming, C. Englund, R. Hevner, and Z. Xia.** 2009. ERK5 MAP kinase regulates Neurogenin1 during cortical neurogenesis. *PLoS ONE* **4**:e5204.
64. **Das, S., J. Cho, I. Lambertz, M. A. Kelliher, A. G. Eliopoulos, K. Du, and P. N. Tsichlis.** 2005. Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *J Biol Chem* **280**:23748-57.
65. **Davis, R. J.** 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239-52.
66. **Davis, R. J.** 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **268**:14553-6.
67. **Deacon, K., and J. L. Blank.** 1999. MEK kinase 3 directly activates MKK6 and MKK7, specific activators of the p38 and c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* **274**:16604-10.
68. **Dean, J. L., G. Sully, A. R. Clark, and J. Saklatvala.** 2004. The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal* **16**:1113-21.
69. **Derijard, B., M. Hibi, I. H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, and R. J. Davis.** 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**:1025-37.
70. **Derijard, B., J. Raingeaud, T. Barrett, I. H. Wu, J. Han, R. J. Ulevitch, and R. J. Davis.** 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**:682-5.
71. **Deshmukh, K., K. Anamika, and N. Srinivasan.** Evolution of domain combinations in protein kinases and its implications for functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol* **102**:1-15.
72. **DeSilva, D. R., E. A. Jones, M. F. Favata, B. D. Jaffee, R. L. Magolda, J. M. Trzaskos, and P. A. Scherle.** 1998. Inhibition of mitogen-activated protein kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *J Immunol* **160**:4175-81.
73. **Dhanasekaran, D. N., K. Kashef, C. M. Lee, H. Xu, and E. P. Reddy.** 2007. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* **26**:3185-202.
74. **Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath, and W. Kolch.** 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**:3279-90.
75. **Dong, C., R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* **20**:55-72.
76. **Dong, C., D. D. Yang, C. Tournier, A. J. Whitmarsh, J. Xu, R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 2000. JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* **405**:91-4.
77. **Dong, C., D. D. Yang, M. Wisk, A. J. Whitmarsh, R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 1998. Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* **282**:2092-5.
78. **Dong, F., J. S. Gutkind, and A. C. Lerner.** 2001. Granulocyte colony-stimulating factor induces ERK5 activation, which is differentially regulated by protein-tyrosine kinases and protein kinase C. Regulation of cell proliferation and survival. *J Biol Chem* **276**:10811-6.

79. **Downward, J.** 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**:11-22.
80. **Eisenman, R. N.** 2001. Deconstructing myc. *Genes Dev* **15**:2023-30.
81. **English, J. M., G. Pearson, T. Hockenberry, L. Shivakumar, M. A. White, and M. H. Cobb.** 1999. Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. *J Biol Chem* **274**:31588-92.
82. **Fan, G., S. E. Merritt, M. Kortenjann, P. E. Shaw, and L. B. Holzman.** 1996. Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mapk but not ERK2. *J Biol Chem* **271**:24788-93.
83. **Fischer, A. M., C. D. Katayama, G. Pages, J. Pouyssegur, and S. M. Hedrick.** 2005. The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* **23**:431-43.
84. **Freshney, N. W., L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan, and J. Saklatvala.** 1994. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**:1039-49.
85. **Gaestel, M.** 2006. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:120-30.
86. **Garcia, J. I., G. Zalba, S. D. Detera-Wadleigh, and C. de Miguel.** 1996. Isolation of a cDNA encoding the rat MAP-kinase homolog of human p63mapk. *Mamm Genome* **7**:810-4.
87. **Gerits, N., T. Mikalsen, S. Kostenko, A. Shiryayev, M. Johannessen, and U. Moens.** 2007. Modulation of F-actin rearrangement by the cyclic AMP/cAMP-dependent protein kinase (PKA) pathway is mediated by MAPK-activated protein kinase 5 and requires PKA-induced nuclear export of MK5. *J Biol Chem* **282**:37232-43.
88. **Gille, H., M. Kortenjann, O. Thomae, C. Moomaw, C. Slaughter, M. H. Cobb, and P. E. Shaw.** 1995. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J* **14**:951-62.
89. **Gille, H., A. D. Sharrocks, and P. E. Shaw.** 1992. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* **358**:414-7.
90. **Goedert, M., A. Cuenda, M. Craxton, R. Jakes, and P. Cohen.** 1997. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J* **16**:3563-71.
91. **Goldsmith, Z. G., and D. N. Dhanasekaran.** 2007. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**:3122-42.
92. **Goloudina, A., H. Yamaguchi, D. B. Chervyakova, E. Appella, A. J. Fornace, Jr., and D. V. Bulavin.** 2003. Regulation of human Cdc25A stability by Serine 75 phosphorylation is not sufficient to activate a S phase checkpoint. *Cell Cycle* **2**:473-8.
93. **Gonzalez, F. A., D. L. Raden, M. R. Rigby, and R. J. Davis.** 1992. Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett* **304**:170-8.
94. **Graves, L. M., H. I. Guy, P. Kozlowski, M. Huang, E. Lazarowski, R. M. Pope, M. A. Collins, E. N. Dahlstrand, H. S. Earp, 3rd, and D. R. Evans.** 2000. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* **403**:328-32.
95. **Grzybowska, E. A., A. Wilczynska, and J. A. Siedlecki.** 2001. Regulatory functions of 3'UTRs. *Biochem Biophys Res Commun* **288**:291-5.

96. **Gupta, S., T. Barrett, A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, H. K. Sluss, B. Derijard, and R. J. Davis.** 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* **15**:2760-70.
97. **Gupta, S., D. Campbell, B. Derijard, and R. J. Davis.** 1995. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* **267**:389-93.
98. **Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs, and R. J. Ulevitch.** 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**:808-11.
99. **Han, J., J. D. Lee, Y. Jiang, Z. Li, L. Feng, and R. J. Ulevitch.** 1996. Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem* **271**:2886-91.
100. **Hanks, S. K., and T. Hunter.** 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9**:576-96.
101. **Hanks, S. K., A. M. Quinn, and T. Hunter.** 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**:42-52.
102. **Hansen, C. A., J. Bartek, and S. Jensen.** 2008. A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3. *Cell Cycle* **7**:325-34.
103. **Harbour, J. W., and D. C. Dean.** 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14**:2393-409.
104. **Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S. J. Elledge.** 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**:805-16.
105. **Hatano, N., Y. Mori, M. Oh-hora, A. Kosugi, T. Fujikawa, N. Nakai, H. Niwa, J. Miyazaki, T. Hamaoka, and M. Ogata.** 2003. Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* **8**:847-56.
106. **Hay, N., and N. Sonenberg.** 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* **18**:1926-45.
107. **Hayashi, M., S. W. Kim, K. Imanaka-Yoshida, T. Yoshida, E. D. Abel, B. Eliceiri, Y. Yang, R. J. Ulevitch, and J. D. Lee.** 2004. Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. *J Clin Invest* **113**:1138-48.
108. **Henrich, L. M., J. A. Smith, D. Kitt, T. M. Errington, B. Nguyen, A. M. Traish, and D. A. Lannigan.** 2003. Extracellular signal-regulated kinase 7, a regulator of hormone-dependent estrogen receptor destruction. *Mol Cell Biol* **23**:5979-88.
109. **Heo, Y. S., S. K. Kim, C. I. Seo, Y. K. Kim, B. J. Sung, H. S. Lee, J. I. Lee, S. Y. Park, J. H. Kim, K. Y. Hwang, Y. L. Hyun, Y. H. Jeon, S. Ro, J. M. Cho, T. G. Lee, and C. H. Yang.** 2004. Structural basis for the selective inhibition of JNK1 by the scaffolding protein JIP1 and SP600125. *EMBO J* **23**:2185-95.
110. **Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden, and M. Karin.** 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* **7**:2135-48.
111. **Hirai, S., M. Katoh, M. Terada, J. M. Kyriakis, L. I. Zon, A. Rana, J. Avruch, and S. Ohno.** 1997. MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* **272**:15167-73.
112. **Hitti, E., T. Iakovleva, M. Brook, S. Deppenmeier, A. D. Gruber, D. Radzioch, A. R. Clark, P. J. Blackshear, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2006. Mitogen-

- activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol Cell Biol* **26**:2399-407.
113. **Hodge, C., J. Liao, M. Stofega, K. Guan, C. Carter-Su, and J. Schwartz.** 1998. Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Biol Chem* **273**:31327-36.
 114. **Hoeflich, K. P., M. T. Eby, W. F. Forrester, D. C. Gray, J. Y. Tien, H. M. Stern, L. J. Murray, D. P. Davis, Z. Modrusan, and S. Seshagiri.** 2006. Regulation of ERK3/MAPK6 expression by BRAF. *Int J Oncol* **29**:839-49.
 115. **Hu, M. C., W. R. Qiu, and Y. P. Wang.** 1997. JNK1, JNK2 and JNK3 are p53 N-terminal serine 34 kinases. *Oncogene* **15**:2277-87.
 116. **Hunter, T.** 2000. Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**:113-27.
 117. **Huse, M., and J. Kuriyan.** 2002. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**:275-82.
 118. **Hutchison, M., K. S. Berman, and M. H. Cobb.** 1998. Isolation of TAO1, a protein kinase that activates MEKs in stress-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* **273**:28625-32.
 119. **Ichijo, H.** 1999. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* **18**:6087-93.
 120. **Ichijo, H., E. Nishida, K. Irie, P. ten Dijke, M. Saitoh, T. Moriguchi, M. Takagi, K. Matsumoto, K. Miyazono, and Y. Gotoh.** 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275**:90-4.
 121. **Ishitani, T., S. Kishida, J. Hyodo-Miura, N. Ueno, J. Yasuda, M. Waterman, H. Shibuya, R. T. Moon, J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto.** 2003. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* **23**:131-9.
 122. **Ishitani, T., J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto.** 2003. Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* **23**:1379-89.
 123. **Ishitani, T., J. Ninomiya-Tsuji, S. Nagai, M. Nishita, M. Meneghini, N. Barker, M. Waterman, B. Bowerman, H. Clevers, H. Shibuya, and K. Matsumoto.** 1999. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* **399**:798-802.
 124. **Jaeschke, A., M. Karasarides, J. J. Ventura, A. Ehrhardt, C. Zhang, R. A. Flavell, K. M. Shokat, and R. J. Davis.** 2006. JNK2 is a positive regulator of the cJun transcription factor. *Mol Cell* **23**:899-911.
 125. **Jaiswal, R. K., S. A. Moodie, A. Wolfman, and G. E. Landreth.** 1994. The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras. *Mol Cell Biol* **14**:6944-53.
 126. **Janknecht, R., W. H. Ernst, and A. Nordheim.** 1995. SAP1a is a nuclear target of signaling cascades involving ERKs. *Oncogene* **10**:1209-16.
 127. **Jeffrey, P. D., A. A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massague, and N. P. Pavletich.** 1995. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**:313-20.

128. **Jiang, Y., C. Chen, Z. Li, W. Guo, J. A. Gegner, S. Lin, and J. Han.** 1996. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* **271**:17920-6.
129. **Jiang, Y., H. Gram, M. Zhao, L. New, J. Gu, L. Feng, F. Di Padova, R. J. Ulevitch, and J. Han.** 1997. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* **272**:30122-8.
130. **Johnson, D. A., P. Akamine, E. Radzio-Andzelm, M. Madhusudan, and S. S. Taylor.** 2001. Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* **101**:2243-70.
131. **Johnson, G. L., and K. Nakamura.** 2007. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* **1773**:1341-8.
132. **Johnson, L. N., M. E. Noble, and D. J. Owen.** 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**:149-58.
133. **Johnson, T. R., J. R. Biggs, S. E. Winbourn, and A. S. Kraft.** 2000. Regulation of dual-specificity phosphatases M3/6 and hVH5 by phorbol esters. Analysis of a delta-like domain. *J Biol Chem* **275**:31755-62.
134. **Julien, C., P. Coulombe, and S. Meloche.** 2003. Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J Biol Chem* **278**:42615-24.
135. **Junttila, M. R., S. P. Li, and J. Westermarck.** 2008. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J* **22**:954-65.
136. **Kamakura, S., T. Moriguchi, and E. Nishida.** 1999. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* **274**:26563-71.
137. **Kanei-Ishii, C., J. Ninomiya-Tsuji, J. Tanikawa, T. Nomura, T. Ishitani, S. Kishida, K. Kokura, T. Kurahashi, E. Ichikawa-Iwata, Y. Kim, K. Matsumoto, and S. Ishii.** 2004. Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev* **18**:816-29.
138. **Kanei-Ishii, C., T. Nomura, T. Takagi, N. Watanabe, K. I. Nakayama, and S. Ishii.** 2008. Fbxw7 acts as an E3 ubiquitin ligase that targets c-Myb for nemo-like kinase (NLK)-induced degradation. *J Biol Chem* **283**:30540-8.
139. **Kant, S., S. Schumacher, M. K. Singh, A. Kispert, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2006. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem* **281**:35511-9.
140. **Karin, M.** 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **270**:16483-6.
141. **Kasler, H. G., J. Victoria, O. Duramad, and A. Winoto.** 2000. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* **20**:8382-9.
142. **Kato, Y., V. V. Kravchenko, R. I. Tapping, J. Han, R. J. Ulevitch, and J. D. Lee.** 1997. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J* **16**:7054-66.
143. **Kato, Y., R. I. Tapping, S. Huang, M. H. Watson, R. J. Ulevitch, and J. D. Lee.** 1998. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* **395**:713-6.

144. **Kato, Y., M. Zhao, A. Morikawa, T. Sugiyama, D. Chakravortty, N. Koide, T. Yoshida, R. I. Tapping, Y. Yang, T. Yokochi, and J. D. Lee.** 2000. Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. *J Biol Chem* **275**:18534-40.
145. **Kazlauskas, A., and J. A. Cooper.** 1988. Protein kinase C mediates platelet-derived growth factor-induced tyrosine phosphorylation of p42. *J Cell Biol* **106**:1395-402.
146. **Keyse, S. M.** 2000. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* **12**:186-92.
147. **Kiess, M., R. M. Gill, and P. A. Hamel.** 1995. Expression of the positive regulator of cell cycle progression, cyclin D3, is induced during differentiation of myoblasts into quiescent myotubes. *Oncogene* **10**:159-66.
148. **Kishi, H., K. Nakagawa, M. Matsumoto, M. Suga, M. Ando, Y. Taya, and M. Yamaizumi.** 2001. Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38MAPK without phosphorylation at Ser15 and Ser20. *J Biol Chem* **276**:39115-22.
149. **Kleines, M., A. Gartner, K. Ritter, and L. Schaade.** 2000. Early steps in termination of the immortalization state in Burkitt lymphoma: induction of genes involved in signal transduction, transcription, and trafficking by the ganglioside IV(3)NeuAc-nLcOse(4)Cer. *Biochim Biophys Acta* **1492**:139-44.
150. **Klevernic, I. V., M. J. Stafford, N. Morrice, M. Pegg, S. Morton, and P. Cohen.** 2006. Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8. *Biochem J* **394**:365-73.
151. **Klinger, S., B. Turgeon, K. Levesque, G. A. Wood, K. M. Aagaard-Tillery, and S. Meloche.** 2009. Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:16710-5.
152. **Knighton, D. R., J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S. Taylor, and J. M. Sowadski.** 1991. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**:407-14.
153. **Kojima, H., T. Sasaki, T. Ishitani, S. Iemura, H. Zhao, S. Kaneko, H. Kunitomo, T. Natsume, K. Matsumoto, and K. Nakajima.** 2005. STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:4524-9.
154. **Kontoyiannis, D., M. Pasparakis, T. T. Pizarro, F. Cominelli, and G. Kollias.** 1999. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* **10**:387-98.
155. **Kortenjann, M., M. Nehls, A. J. Smith, R. Carsetti, J. Schuler, G. Kohler, and T. Boehm.** 2001. Abnormal bone marrow stroma in mice deficient for nemo-like kinase, Nlk. *Eur J Immunol* **31**:3580-7.
156. **Kostenko, S., M. Johannessen, and U. Moens.** 2009. PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cell Signal* **21**:712-8.
157. **Kotlyarov, A., A. Neininger, C. Schubert, R. Eckert, C. Birchmeier, H. D. Volk, and M. Gaestel.** 1999. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat Cell Biol* **1**:94-7.

158. **Kruys, V., and G. Huez.** 1994. Translational control of cytokine expression by 3' UA-rich sequences. *Biochimie* **76**:862-6.
159. **Kuan, C. Y., D. D. Yang, D. R. Samanta Roy, R. J. Davis, P. Rakic, and R. A. Flavell.** 1999. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* **22**:667-76.
160. **Kuo, W. L., C. J. Duke, M. K. Abe, E. L. Kaplan, S. Gomes, and M. R. Rosner.** 2004. ERK7 expression and kinase activity is regulated by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **279**:23073-81.
161. **Kyriakis, J. M., and J. Avruch.** 1990. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem* **265**:17355-63.
162. **Kyriakis, J. M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E. A. Rubie, M. F. Ahmad, J. Avruch, and J. R. Woodgett.** 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**:156-60.
163. **Laplane, M., and D. M. Sabatini.** 2009. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* **122**:3589-94.
164. **Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landvatter, and et al.** 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**:739-46.
165. **Lee, J. D., R. J. Ulevitch, and J. Han.** 1995. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **213**:715-24.
166. **Li, Z., Y. Jiang, R. J. Ulevitch, and J. Han.** 1996. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **228**:334-40.
167. **Lindqvist, A., V. Rodriguez-Bravo, and R. H. Medema.** 2009. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol* **185**:193-202.
168. **Lochhead, P. A., R. Kinstrie, G. Sibbet, T. Rawjee, N. Morrice, and V. Cleghon.** 2006. A chaperone-dependent GSK3beta transitional intermediate mediates activation-loop autophosphorylation. *Mol Cell* **24**:627-33.
169. **Lochhead, P. A., G. Sibbet, N. Morrice, and V. Cleghon.** 2005. Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell* **121**:925-36.
170. **Lomaga, M. A., W. C. Yeh, I. Sarosi, G. S. Duncan, C. Furlonger, A. Ho, S. Morony, C. Capparelli, G. Van, S. Kaufman, A. van der Heiden, A. Itie, A. Wakeham, W. Khoo, T. Sasaki, Z. Cao, J. M. Penninger, C. J. Paige, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, W. J. Boyle, D. V. Goeddel, and T. W. Mak.** 1999. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* **13**:1015-24.
171. **Lu, H. T., D. D. Yang, M. Wysk, E. Gatti, I. Mellman, R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 1999. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J* **18**:1845-57.
172. **Ma, L., Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and P. P. Pandolfi.** 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* **121**:179-93.
173. **Manke, I. A., A. Nguyen, D. Lim, M. Q. Stewart, A. E. Elia, and M. B. Yaffe.** 2005. MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M

- transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell* **17**:37-48.
174. **Manning, G., G. D. Plowman, T. Hunter, and S. Sudarsanam.** 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* **27**:514-20.
 175. **Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam.** 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**:1912-34.
 176. **Mansour, S. J., W. T. Matten, A. S. Hermann, J. M. Candia, S. Rong, K. Fukasawa, G. F. Vande Woude, and N. G. Ahn.** 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**:966-70.
 177. **Marais, R., and C. J. Marshall.** 1996. Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv* **27**:101-25.
 178. **Marinissen, M. J., M. Chiariello, M. Pallante, and J. S. Gutkind.** 1999. A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. *Mol Cell Biol* **19**:4289-301.
 179. **Mazzucchelli, C., C. Vantaggiato, A. Ciamei, S. Fasano, P. Pakhotin, W. Krezel, H. Welzl, D. P. Wolfer, G. Pages, O. Valverde, A. Marowsky, A. Porrazzo, P. C. Orban, R. Maldonado, M. U. Ehrenguber, V. Cestari, H. P. Lipp, P. F. Chapman, J. Pouyssegur, and R. Brambilla.** 2002. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* **34**:807-20.
 180. **McKay, M. M., and D. K. Morrison.** 2007. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* **26**:3113-21.
 181. **Meloche, S.** 1995. Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. *J Cell Physiol* **163**:577-88.
 182. **Meloche, S.** 2008. MAPK4 (mitogen-activated protein kinase 4). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*
 183. **Meloche, S.** 2008. MAPK6 (mitogen-activated protein kinase 6). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.
 184. **Meloche, S., B. G. Beatty, and J. Pellerin.** 1996. Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene* **13**:1575-9.
 185. **Meloche, S., and J. Pouyssegur.** 2007. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* **26**:3227-39.
 186. **Meloche, S., K. Seuwen, G. Pages, and J. Pouyssegur.** 1992. Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol* **6**:845-54.
 187. **Mikhailov, A., M. Shinohara, and C. L. Rieder.** 2004. Topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors delay the G2/M transition by triggering the p38 MAPK checkpoint pathway. *J Cell Biol* **166**:517-26.
 188. **Morgan, D. O.** 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**:131-4.
 189. **Moriguchi, T., N. Kuroyanagi, K. Yamaguchi, Y. Gotoh, K. Irie, T. Kano, K. Shirakabe, Y. Muro, H. Shibuya, K. Matsumoto, E. Nishida, and M. Hagiwara.** 1996. A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem* **271**:13675-9.
 190. **Morimoto, H., K. Kondoh, S. Nishimoto, K. Terasawa, and E. Nishida.** 2007. Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *J Biol Chem* **282**:35449-56.

191. **Morrison, D. K., and R. J. Davis.** 2003. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**:91-118.
192. **Muda, M., A. Theodosiou, N. Rodrigues, U. Boschert, M. Camps, C. Gillieron, K. Davies, A. Ashworth, and S. Arkinstall.** 1996. The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **271**:27205-8.
193. **Mudgett, J. S., J. Ding, L. Guh-Siesel, N. A. Chartrain, L. Yang, S. Gopal, and M. M. Shen.** 2000. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:10454-9.
194. **Mulloy, R., S. Salinas, A. Philips, and R. A. Hipskind.** 2003. Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene* **22**:5387-98.
195. **Murphy, L. O., S. Smith, R. H. Chen, D. C. Fingar, and J. Blenis.** 2002. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* **4**:556-64.
196. **Natoli, G., A. Costanzo, A. Ianni, D. J. Templeton, J. R. Woodgett, C. Balsano, and M. Levrero.** 1997. Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science* **275**:200-3.
197. **Neininger, A., D. Kontoyiannis, A. Kotlyarov, R. Winzen, R. Eckert, H. D. Volk, H. Holtmann, G. Kollias, and M. Gaestel.** 2002. MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J Biol Chem* **277**:3065-8.
198. **New, L., Y. Jiang, and J. Han.** 2003. Regulation of PRAK subcellular location by p38 MAP kinases. *Mol Biol Cell* **14**:2603-16.
199. **New, L., Y. Jiang, M. Zhao, K. Liu, W. Zhu, L. J. Flood, Y. Kato, G. C. Parry, and J. Han.** 1998. PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *Embo J* **17**:3372-84.
200. **Newbern, J., J. Zhong, R. S. Wickramasinghe, X. Li, Y. Wu, I. Samuels, N. Cherosky, J. C. Karlo, B. O'Loughlin, J. Wikenheiser, M. Gargsha, Y. Q. Doughman, J. Charron, D. D. Ginty, M. Watanabe, S. C. Saitta, W. D. Snider, and G. E. Landreth.** 2008. Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:17115-20.
201. **Ni, H., X. S. Wang, K. Diener, and Z. Yao.** 1998. MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **243**:492-6.
202. **Niida, H., and M. Nakanishi.** 2006. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **21**:3-9.
203. **Nilsson, I., and I. Hoffmann.** 2000. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* **4**:107-14.
204. **Nolen, B., S. Taylor, and G. Ghosh.** 2004. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* **15**:661-75.
205. **Obaya, A. J., and J. M. Sedivy.** 2002. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* **59**:126-42.
206. **Ohkawara, B., K. Shirakabe, J. Hyodo-Miura, R. Matsuo, N. Ueno, K. Matsumoto, and H. Shibuya.** 2004. Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF-beta-mediated mesoderm induction. *Genes Dev* **18**:381-6.
207. **Owens, D. M., and S. M. Keyse.** 2007. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**:3203-13.

208. **Pages, G., P. Lenormand, G. L'Allemain, J. C. Chambard, S. Meloche, and J. Pouyssegur.** 1993. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:8319-23.
209. **Pawson, T., and J. D. Scott.** 2005. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci* **30**:286-90.
210. **Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**:153-83.
211. **Price, M. A., F. H. Cruzalegui, and R. Treisman.** 1996. The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *Embo J* **15**:6552-63.
212. **Price, M. A., A. E. Rogers, and R. Treisman.** 1995. Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). *Embo J* **14**:2589-601.
213. **Prickett, T. D., and D. L. Brautigan.** 2007. Cytokine activation of p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis is opposed by alpha-4 targeting of protein phosphatase 2A for site-specific dephosphorylation of MEK3. *Mol Cell Biol* **27**:4217-27.
214. **Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and J. R. Woodgett.** 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**:670-4.
215. **Raingeaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch, and R. J. Davis.** 1995. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* **270**:7420-6.
216. **Raman, M., S. Earnest, K. Zhang, Y. Zhao, and M. H. Cobb.** 2007. TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage. *EMBO J* **26**:2005-14.
217. **Ranganathan, A., G. W. Pearson, C. A. Chrestensen, T. W. Sturgill, and M. H. Cobb.** 2006. The MAP kinase ERK5 binds to and phosphorylates p90 RSK. *Arch Biochem Biophys* **449**:8-16.
218. **Ray, L. B., and T. W. Sturgill.** 1988. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:3753-7.
219. **Regan, C. P., W. Li, D. M. Boucher, S. Spatz, M. S. Su, and K. Kuida.** 2002. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:9248-53.
220. **Reinhardt, H. C., A. S. Aslanian, J. A. Lees, and M. B. Yaffe.** 2007. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* **11**:175-89.
221. **Ridsdale, R., and M. Post.** 2004. Surfactant lipid synthesis and lamellar body formation in glycogen-laden type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**:L743-51.
222. **Robbins, D. J., E. Zhen, H. Owaki, C. A. Vanderbilt, D. Ebert, T. D. Geppert, and M. H. Cobb.** 1993. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem* **268**:5097-106.
223. **Rocheleau, C. E., W. D. Downs, R. Lin, C. Wittmann, Y. Bei, Y. H. Cha, M. Ali, J. R. Priess, and C. C. Mello.** 1997. Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell* **90**:707-16.

224. **Roskoski, R., Jr.** 2004. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **324**:1155-64.
225. **Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, and A. R. Nebreda.** 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**:1027-37.
226. **Roussel, M. F.** 1999. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* **18**:5311-7.
227. **Roux, P. P., B. A. Ballif, R. Anjum, S. P. Gygi, and J. Blenis.** 2004. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13489-94.
228. **Roux, P. P., and J. Blenis.** 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:320-44.
229. **Rubinfeld, H., T. Hanoch, and R. Seger.** 1999. Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *J Biol Chem* **274**:30349-52.
230. **Saba-El-Leil, M. K., F. D. Vella, B. Vernay, L. Voisin, L. Chen, N. Labrecque, S. L. Ang, and S. Meloche.** 2003. An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* **4**:964-8.
231. **Sabapathy, K., K. Hochedlinger, S. Y. Nam, A. Bauer, M. Karin, and E. F. Wagner.** 2004. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell* **15**:713-25.
232. **Sabapathy, K., W. Jochum, K. Hochedlinger, L. Chang, M. Karin, and E. F. Wagner.** 1999. Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* **89**:115-24.
233. **Sabio, G., J. S. Arthur, Y. Kuma, M. Pegg, J. Carr, V. Murray-Tait, F. Centeno, M. Goedert, N. A. Morrice, and A. Cuenda.** 2005. p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *EMBO J* **24**:1134-45.
234. **Saelzler, M. P., C. C. Spackman, Y. Liu, L. C. Martinez, J. P. Harris, and M. K. Abe.** 2006. ERK8 down-regulates transactivation of the glucocorticoid receptor through Hic-5. *J Biol Chem* **281**:16821-32.
235. **Samuels, I. S., J. C. Karlo, A. N. Faruzzi, K. Pickering, K. Herrup, J. D. Sweatt, S. C. Saitta, and G. E. Landreth.** 2008. Deletion of ERK2 mitogen-activated protein kinase identifies its key roles in cortical neurogenesis and cognitive function. *J Neurosci* **28**:6983-95.
236. **Sanchez, I., R. T. Hughes, B. J. Mayer, K. Yee, J. R. Woodgett, J. Avruch, J. M. Kyriakis, and L. I. Zon.** 1994. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* **372**:794-8.
237. **Sauer, K., and C. F. Lehner.** 1995. The role of cyclin E in the regulation of entry into S phase. *Prog Cell Cycle Res* **1**:125-39.
238. **Schafe, G. E., C. M. Atkins, M. W. Swank, E. P. Bauer, J. D. Sweatt, and J. E. LeDoux.** 2000. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* **20**:8177-87.
239. **Schumacher, S., K. Laass, S. Kant, Y. Shi, A. Visel, A. D. Gruber, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2004. Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *EMBO J* **23**:4770-9.

240. **Sears, R., F. Nuckolls, E. Haura, Y. Taya, K. Tamai, and J. R. Nevins.** 2000. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* **14**:2501-14.
241. **Seger, R., D. Seger, A. A. Reszka, E. S. Munar, H. Eldar-Finkelman, G. Dobrowolska, A. M. Jensen, J. S. Campbell, E. H. Fischer, and E. G. Krebs.** 1994. Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) and its mutants in NIH 3T3 cells. Evidence that MAPKK involvement in cellular proliferation is regulated by phosphorylation of serine residues in its kinase subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* **269**:25699-709.
242. **Selcher, J. C., C. M. Atkins, J. M. Trzaskos, R. Paylor, and J. D. Sweatt.** 1999. A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learn Mem* **6**:478-90.
243. **Seternes, O. M., B. Johansen, B. Hegge, M. Johannessen, S. M. Keyse, and U. Moens.** 2002. Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress. *Mol Cell Biol* **22**:6931-45.
244. **Seternes, O. M., T. Mikalsen, B. Johansen, E. Michaelsen, C. G. Armstrong, N. A. Morrice, B. Turgeon, S. Meloche, U. Moens, and S. M. Keyse.** 2004. Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *EMBO J* **23**:4780-91.
245. **Shapiro, P. S., J. N. Evans, R. J. Davis, and J. A. Posada.** 1996. The seven-transmembrane-spanning receptors for endothelin and thrombin cause proliferation of airway smooth muscle cells and activation of the extracellular regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase groups of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **271**:5750-4.
246. **Shaulian, E., and M. Karin.** 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**:2390-400.
247. **She, Q. B., N. Chen, and Z. Dong.** 2000. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem* **275**:20444-9.
248. **Sherr, C. J.** 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* **60**:3689-95.
249. **Sherr, C. J., and J. D. Weber.** 2000. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* **10**:94-9.
250. **Shi, Y., A. Kotlyarov, K. Laabeta, A. D. Gruber, E. Butt, K. Marcus, H. E. Meyer, A. Friedrich, H. D. Volk, and M. Gaestel.** 2003. Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination. *Mol Cell Biol* **23**:7732-41.
251. **Shin, T. H., J. Yasuda, C. E. Rocheleau, R. Lin, M. Soto, Y. Bei, R. J. Davis, and C. C. Mello.** 1999. MOM-4, a MAP kinase kinase kinase-related protein, activates WRM-1/LIT-1 kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*. *Mol Cell* **4**:275-80.
252. **Sluss, H. K., T. Barrett, B. Derijard, and R. J. Davis.** 1994. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol Cell Biol* **14**:8376-84.
253. **Smit, L., A. Baas, J. Kuipers, H. Korswagen, M. van de Wetering, and H. Clevers.** 2004. Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway. *J Biol Chem* **279**:17232-40.

254. **Sohn, S. J., B. K. Sarvis, D. Cado, and A. Winoto.** 2002. ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* **277**:43344-51.
255. **Soloaga, A., S. Thomson, G. R. Wiggin, N. Rampersaud, M. H. Dyson, C. A. Hazzalin, L. C. Mahadevan, and J. S. Arthur.** 2003. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J* **22**:2788-97.
256. **Sorenson, R. L., and T. C. Brelje.** 1997. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* **29**:301-7.
257. **Stegmeier, F., and A. Amon.** 2004. Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu Rev Genet* **38**:203-32.
258. **Sun, M., Y. Wei, L. Yao, J. Xie, X. Chen, H. Wang, J. Jiang, and J. Gu.** 2006. Identification of extracellular signal-regulated kinase 3 as a new interaction partner of cyclin D3. *Biochem Biophys Res Commun* **340**:209-14.
259. **Sun, P., N. Yoshizuka, L. New, B. A. Moser, Y. Li, R. Liao, C. Xie, J. Chen, Q. Deng, M. Yamout, M. Q. Dong, C. G. Frangou, J. R. Yates, 3rd, P. E. Wright, and J. Han.** 2007. PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* **128**:295-308.
260. **Sun, W., K. Kesavan, B. C. Schaefer, T. P. Garrington, M. Ware, N. L. Johnson, E. W. Gelfand, and G. L. Johnson.** 2001. MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *J Biol Chem* **276**:5093-100.
261. **Tak, H., E. Jang, S. B. Kim, J. Park, J. Suk, Y. S. Yoon, J. K. Ahn, J. H. Lee, and C. O. Joe.** 2007. 14-3-3epsilon inhibits MK5-mediated cell migration by disrupting F-actin polymerization. *Cell Signal* **19**:2379-87.
262. **Takekawa, M., T. Maeda, and H. Saito.** 1998. Protein phosphatase 2Calpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *Embo J* **17**:4744-52.
263. **Tamura, K., T. Sudo, U. Senftleben, A. M. Dadak, R. Johnson, and M. Karin.** 2000. Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* **102**:221-31.
264. **Tamura, S., M. Hanada, M. Ohnishi, K. Katsura, M. Sasaki, and T. Kobayashi.** 2002. Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur J Biochem* **269**:1060-6.
265. **Tamura, S., S. Toriumi, J. Saito, K. Awano, T. A. Kudo, and T. Kobayashi.** 2006. PP2C family members play key roles in regulation of cell survival and apoptosis. *Cancer Sci* **97**:563-7.
266. **Tanguay, P. L., G. Rodier, and S. Meloche.** C-terminal domain phosphorylation of ERK3 controlled by Cdk1 and Cdc14 regulates its stability in mitosis. *Biochem J* **428**:103-11.
267. **Tanoue, T., M. Adachi, T. Moriguchi, and E. Nishida.** 2000. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* **2**:110-6.
268. **Tanoue, T., and E. Nishida.** 2003. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* **15**:455-62.
269. **Taylor, W. R., and G. R. Stark.** 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**:1803-15.

270. **Theodosiou, A., A. Smith, C. Gillieron, S. Arkinstall, and A. Ashworth.** 1999. MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases. *Oncogene* **18**:6981-8.
271. **Thomson, S., L. C. Mahadevan, and A. L. Clayton.** 1999. MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin Cell Dev Biol* **10**:205-14.
272. **Thorpe, C. J., A. Schlesinger, J. C. Carter, and B. Bowerman.** 1997. Wnt signaling polarizes an early *C. elegans* blastomere to distinguish endoderm from mesoderm. *Cell* **90**:695-705.
273. **Tibbles, L. A., Y. L. Ing, F. Kiefer, J. Chan, N. Iscove, J. R. Woodgett, and N. J. Lassam.** 1996. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *Embo J* **15**:7026-35.
274. **Tournier, C., P. Hess, D. D. Yang, J. Xu, T. K. Turner, A. Nimnual, D. Barsagi, S. N. Jones, R. A. Flavell, and R. J. Davis.** 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**:870-4.
275. **Tournier, C., A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, T. Barrett, and R. J. Davis.** 1997. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7337-42.
276. **Turgeon, B., B. F. Lang, and S. Meloche.** 2002. The protein kinase ERK3 is encoded by a single functional gene: genomic analysis of the ERK3 gene family. *Genomics* **80**:673-80.
277. **Turgeon, B., M. K. Saba-El-Leil, and S. Meloche.** 2000. Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *Biochem J* **346 Pt 1**:169-75.
278. **Valjent, E., J. C. Corvol, C. Pages, M. J. Besson, R. Maldonado, and J. Caboche.** 2000. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci* **20**:8701-9.
279. **Voisin, L., C. Julien, S. Duhamel, K. Gopalbhai, I. Claveau, M. K. Saba-El-Leil, I. G. Rodrigue-Gervais, L. Gaboury, D. Lamarre, M. Basik, and S. Meloche.** 2008. Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer* **8**:337.
280. **Walz, R., R. Roesler, J. Quevedo, I. C. Rockenbach, O. B. Amaral, M. R. Vianna, G. Lenz, J. H. Medina, and I. Izquierdo.** 1999. Dose-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by immediate post-training infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical structures. *Behav Brain Res* **105**:219-23.
281. **Waskiewicz, A. J., and J. A. Cooper.** 1995. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol* **7**:798-805.
282. **Weinhaus, A. J., L. E. Stout, and R. L. Sorenson.** 1996. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets. *Endocrinology* **137**:1640-9.
283. **Whitmarsh, A. J., and R. J. Davis.** 1998. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* **23**:481-5.

284. **Whitmarsh, A. J., and R. J. Davis.** 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* **74**:589-607.
285. **Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson.** 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**:143-80.
286. **Wiggin, G. R., A. Soloaga, J. M. Foster, V. Murray-Tait, P. Cohen, and J. S. Arthur.** 2002. MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol Cell Biol* **22**:2871-81.
287. **Wysk, M., D. D. Yang, H. T. Lu, R. A. Flavell, and R. J. Davis.** 1999. Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:3763-8.
288. **Xing, J., D. D. Ginty, and M. E. Greenberg.** 1996. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**:959-63.
289. **Xu, W., S. C. Harrison, and M. J. Eck.** 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* **385**:595-602.
290. **Yadav, S. S., and W. T. Miller.** 2007. Cooperative activation of Src family kinases by SH3 and SH2 ligands. *Cancer Lett* **257**:116-23.
291. **Yamaguchi, K., K. Shirakabe, H. Shibuya, K. Irie, I. Oishi, N. Ueno, T. Taniguchi, E. Nishida, and K. Matsumoto.** 1995. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* **270**:2008-11.
292. **Yamamoto, T., M. Ebisuya, F. Ashida, K. Okamoto, S. Yonehara, and E. Nishida.** 2006. Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol* **16**:1171-82.
293. **Yamauchi, J., M. Nagao, Y. Kaziro, and H. Itoh.** 1997. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of Gbetagamma and Galphaq/11 subunits. *J Biol Chem* **272**:27771-7.
294. **Yan, C., H. Luo, J. D. Lee, J. Abe, and B. C. Berk.** 2001. Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem* **276**:10870-8.
295. **Yan, L., J. Carr, P. R. Ashby, V. Murry-Tait, C. Thompson, and J. S. Arthur.** 2003. Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol* **3**:11.
296. **Yan, M., T. Dai, J. C. Deak, J. M. Kyriakis, L. I. Zon, J. R. Woodgett, and D. J. Templeton.** 1994. Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* **372**:798-800.
297. **Yang, C. C., O. I. Ornatsky, J. C. McDermott, T. F. Cruz, and C. A. Prody.** 1998. Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res* **26**:4771-7.
298. **Yang, D. D., D. Conze, A. J. Whitmarsh, T. Barrett, R. J. Davis, M. Rincon, and R. A. Flavell.** 1998. Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* **9**:575-85.
299. **Yang, D. D., C. Y. Kuan, A. J. Whitmarsh, M. Rincon, T. S. Zheng, R. J. Davis, P. Rakic, and R. A. Flavell.** 1997. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* **389**:865-70.

300. **Yang, S. H., P. R. Yates, A. J. Whitmarsh, R. J. Davis, and A. D. Sharrocks.** 1998. The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Mol Cell Biol* **18**:710-20.
301. **Yao, Y., W. Li, J. Wu, U. A. Germann, M. S. Su, K. Kuida, and D. M. Boucher.** 2003. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:12759-64.
302. **Yoon, S., and R. Seger.** 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**:21-44.
303. **Yuasa, T., S. Ohno, J. H. Kehrl, and J. M. Kyriakis.** 1998. Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J Biol Chem* **273**:22681-92.
304. **Yujiri, T., S. Sather, G. R. Fanger, and G. L. Johnson.** 1998. Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* **282**:1911-4.
305. **Zhao, H., J. L. Watkins, and H. Piwnica-Worms.** 2002. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:14795-800.
306. **Zheng, C. F., and K. L. Guan.** 1993. Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* **268**:11435-9.
307. **Zhou, G., Z. Q. Bao, and J. E. Dixon.** 1995. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **270**:12665-9.
308. **Zhou, T., L. Sun, J. Humphreys, and E. J. Goldsmith.** 2006. Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinase ERK2. *Structure* **14**:1011-9.
309. **Zhu, A. X., Y. Zhao, D. E. Moller, and J. S. Flier.** 1994. Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3. *Mol Cell Biol* **14**:8202-11.
310. **Zinck, R., M. A. Cahill, M. Kracht, C. Sachsenmaier, R. A. Hipskind, and A. Nordheim.** 1995. Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Mol Cell Biol* **15**:4930-8.

CHAPITRE 2

2 Caractérisation du mécanisme d'activation de la MAP kinase atypique Erk3 et Erk4

2.1 Mise en situation

L'activité des MAP kinases est régulée principalement par la phosphorylation de leur boucle d'activation. Chez les MAP kinases classiques, la boucle d'activation est composée du motif TXY et ces résidus sont phosphorylés *en trans* par une autre kinase, elle-même régulée par phosphorylation. Erk3 et Erk4 sont considérées comme des MAP kinases atypiques. L'une des caractéristiques majeures différenciant ces deux MAP kinases des autres membres de cette famille est la présence d'un motif SEG en remplacement du motif TXY. Cette différence est importante puisqu'elle implique que l'activité enzymatique de Erk3 et Erk4 puisse être régulée par mono-phosphorylation contrairement aux MAP kinases classiques.

Erk3 et Erk4 sont des kinases très peu caractérisées. D'ailleurs, on ignore si l'activation de cette famille de kinase s'inscrit dans le cadre de l'activation d'un module kinase. Jusqu'à maintenant, aucune kinase de la boucle d'activation de Erk4/Erk3 n'a été identifiée. Néanmoins, il a été montré que la S¹⁸⁹ de la boucle d'activation de Erk3 est phosphorylée *in vivo* et qu'une kinase capable de phosphoryler cette sérine a partiellement été purifiée sans toutefois être caractérisée davantage. Pour ce qui est des substrats de Erk3 et Erk4, la MAPKAP kinase MK5/PRAK est le seul substrat identifié à ce jour. Erk4/Erk3 régulent l'activité de MK5 en modulant son activité kinase ainsi que sa localisation subcellulaire. L'impact fonctionnel de cette interaction n'a pas été élucidé.

Le mécanisme régulant la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk4 et Erk3 ainsi que l'impact de cette phosphorylation sur l'activité enzymatique ne sont pas connus. Ce chapitre traite de la caractérisation du mécanisme d'activation de Erk4 et Erk3 et de l'impact de la phosphorylation de leur boucle d'activation sur la régulation de l'activité de MK5. Je fais partie des trois premiers auteurs de cet article. J'ai généré la majorité des résultats sur Erk4 et participé à la rédaction de l'article.

2.2 Article 1

Activation Loop Phosphorylation of the Atypical MAP Kinases ERK3 and ERK4 is Required for Binding, Activation and Cytoplasmic Relocalization of MK5

PAUL DÉLÉRIS,¹ JUSTINE ROUSSEAU,^{1,2} PHILIPPE COULOMBE,^{1,2} GENEVIÈVE RODIER,¹ PIERRE-LUC TANGUAY,^{1,2} AND SYLVAIN MELOCHE^{1,2,3*}

¹Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

Departments of ²Molecular Biology and ³Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

P. Délérís, J. Rousseau and P. Coulombe contributed equally to this work

P. Coulombe present address is: Institut de Génétique Humaine, CNRS, 34396 Montpellier, France

G. Rodier present address is : Institut de Génétique Moléculaire, CNRS-UMII, 34293 Montpellier, France

Running Head: ERK3/ERK4 activation loop phosphorylation

Keywords: **MAP kinases, ERK3, MK5, activation loop, nucleocytoplasmic shuttling**

Total number of figures: 10 plus 4 supplementary

Contract grant sponsor: Canadian Institutes for Health Research

*Corresponding author: Dr Sylvain Meloche
 Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
 Université de Montréal
 P.O. Box 6128, Station Centre-Ville
 Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada
 Tel.: (514) 343-6966

Article accepté le 11 juillet 2008

Journal of Cellular Physiology, Volume 217 Issue 3, Pages 778 – 788

ABSTRACT

Mitogen-activated protein (MAP) kinases are typical examples of protein kinases whose enzymatic activity is mainly controlled by activation loop phosphorylation. The classical MAP kinases ERK1/ERK2, JNK, p38 and ERK5 all contain the conserved Thr-Xxx-Tyr motif in their activation loop that is dually phosphorylated by members of the MAP kinase kinases family. Much less is known about the regulation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4. These kinases display structural features that distinguish them from other MAP kinases, notably the presence of a single phospho-acceptor site (Ser-Glu-Gly) in the activation loop. Here, we show that ERK3 and ERK4 are phosphorylated in their activation loop *in vivo*. This phosphorylation is exerted, at least in part, *in trans* by an upstream cellular kinase. Contrary to classical MAP kinases, activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is detected in resting cells and is not further stimulated by strong mitogenic or stress stimuli. However, phosphorylation can be modulated indirectly by interaction with the substrate MAP kinase-activated protein kinase 5 (MK5). Importantly, we found that activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 stimulates their intrinsic catalytic activity and is required for the formation of stable active complexes with MK5 and, consequently, for efficient cytoplasmic redistribution of ERK3/ERK4-MK5 complexes. Our results demonstrate the importance of activation loop phosphorylation in the regulation of the ERK3/ERK4 function and highlight differences in the regulation of atypical MAP kinases as compared to classical family members.

INTRODUCTION

Phosphorylation is a common post-translational modification involved in the regulation of protein kinases (16, 25). Phosphorylation can have both positive and negative regulatory effects on protein kinase activity. For instance, Tyr15-phosphorylated Cdk1 is inactive due to steric hindrance of the ATP binding site (21). Activating phosphorylation has been described for a large number of protein kinases. Although phosphorylation events can occur throughout the kinase sequence, a common theme is the phosphorylation of the activation loop (16, 25). The activation loop is an important regulatory segment located within the kinase domain C-terminal lobe, between subdomains VII and VIII, which often contains conserved serine, threonine and/or tyrosine residues that can be reversibly phosphorylated. This phosphorylation can result either from autophosphorylation *in cis* or phosphorylation *in trans* by an upstream activating kinase.

Mitogen-activated protein (MAP) kinases are evolutionarily conserved Ser/Thr kinases, which are components of signal transduction pathways that control diverse biological processes such as cell proliferation, survival, metabolism, inflammation and immune responses (22, 26, 35). MAP kinases are classical examples of protein kinases whose enzymatic activity is mainly if not solely regulated by phosphorylation. They contain a highly conserved Thr-Xxx-Tyr motif in their activation loop that is dually phosphorylated *in trans* by upstream kinases of the MAP kinase kinases family (28). Activation loop phosphorylation of the MAP kinases ERK1 and ERK2 by the MAP kinase kinases MEK1/MEK2 stimulates their catalytic activity by ~1000-fold (29). Solving of the crystal structures of low activity and dually phosphorylated active MAP kinases has uncovered the important role of activation loop phosphorylation for their enzymatic activity. In the case of ERK2, phosphorylation of the Thr and Tyr residues induces a conformational change of the loop that brings the phosphorylated residues into alignment with arginine-rich surface binding sites, thereby promoting domain closure and allowing an optimal orientation of the catalytic residues (5, 36). Phosphorylation of the tyrosine also remolds the P+1 specificity pocket, contributing to the recognition of proline-containing substrates. More recently, hydrogen exchange mass spectrometry analysis has revealed that phosphorylation of the activation loop also contributes to the formation of a binding site for DEF motif-containing substrates and nucleoporins (23).

ERK3 and ERK4 define a distinct subfamily of atypical MAP kinases that are found exclusively in vertebrates (7). These kinases display a number of structural features that distinguish them from conventional MAP kinases. Notably, they contain the sequence Ser-Glu-Gly in their activation loop instead of the conserved Thr-Xxx-Tyr motif (3, 24, 37). The physiological functions of ERK3 and ERK4 are poorly understood. There is evidence that ERK3 may be involved in the regulation of cell proliferation and differentiation. ERK3 mRNA and protein levels are elevated in terminally differentiated and growth arrested cells (3, 10, 20). Moreover, overexpression of ERK3 inhibits cell cycle progression in some cell lines (10, 11, 18). Recent observations also suggest a role for ERK3 in the regulation of insulin secretion (2). The identification of the MK family member MK5 as the first substrate of ERK3 and ERK4 represented an important step towards a better understanding of ERK3/ERK4 functions. Both ERK3 and ERK4 bind to and phosphorylate MK5, leading to its enzymatic activation (1, 19, 31, 33). Unlike ERK4, activation of MK5 by ERK3 seems to depend in part on the kinase activity of ERK3 but also on its scaffolding ability to increase MK5 autophosphorylation. Association of MK5 with ERK3/ERK4 also results in the cytoplasmic relocation of the complex.

Little is known about the regulation of ERK3 and ERK4 activity. The expression of ERK3 is regulated both at the levels of transcription (15, 38) and protein stability via the ubiquitin-proteasome pathway (9, 10). In contrast, ERK4 is a relatively stable protein (1, 19). Previous studies have shown that ERK3 is phosphorylated on Ser189 in the activation loop, but the functional impact of this phosphorylation has not been addressed in these studies (6, 10). Here, we report that both ERK3 and ERK4 are phosphorylated on the activation loop motif Ser-Glu-Gly in intact cells. This phosphorylation event is observed in unstimulated cells and is minimally influenced by classical MAP kinase stimuli. Importantly, we show that activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is necessary for stable interaction with, enzymatic activation and subcellular relocation of the effector kinase MK5.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

Sorbitol, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), anisomycin and hydrogen peroxide (H_2O_2) were from Sigma. MG132 was from Biomol. SB203580 and U0126 were from LC laboratories. Bisindolylmaleimide, KT5720, forskolin, LY294002 and SP600125 were from Calbiochem. Commercial antibodies were obtained from the following companies: monoclonal anti-phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204), polyclonal anti-phospho-JNK(Thr183/Tyr185), anti-phospho-MK2(Thr334), anti-phospho-Akt(Ser473), anti-phospho-PKD(Ser744/748), anti-phospho-CREB(Ser133) and anti-phospho-p38(Thr183/Tyr185) from Cell Signaling Technology; polyclonal anti-HA (sc-805), anti-Myc (Y-11) and monoclonal anti-phospho-c-Jun(Ser63) from Santa-Cruz Biotechnology; horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit IgG from Biorad; monoclonal anti-Flag (M2) from Sigma; FITC-conjugated donkey anti-rabbit and rhodamine-conjugated donkey anti-mouse from Jackson Laboratories. Monoclonal anti-Myc antibody was prepared from 9E10 hybridoma producing cells. Polyclonal antibody to ERK3 C-terminus (E3-CTE4) and anti-phospho-ERK3(Ser189) have been described (10). Polyclonal ERK4 antibody was generated by immunization of rabbits with His₆-ERK4₃₆₁₋₄₉₇-GST fusion protein expressed in bacteria. ERK4 specific antibody was purified using the Antibodies Purification GST Orientation Kit (Pierce).

Plasmid constructs and mutagenesis

pcDNA3-Myc₆-ERK3 wild type (WT), kinase-dead (KA, K49A/K50A) and SA (S189A) have been described (10, 18). pcDNA3-Myc₆-ERK3-Flag wild type was generated by first subcloning the Flag epitope into EcoRI/XbaI sites of pcDNA3-Myc₆ and then subcloning ERK3 into the EcoRI site of pcDNA3-Myc₆-Flag. The ERK4 cDNA was originally provided by Dr Roger Davis (University of Massachusetts Medical School, MA). pcDNA3-HA-ERK4 was obtained by subcloning ERK4 coding sequence into EcoRI/XbaI sites of pcDNA3-HA (10). pcDNA3-GST was generated by amplifying GST by PCR from pGEX-KG and subcloning it into HindIII/EcoRI sites of pcDNA3. A Kozak sequence was inserted into the 5' oligonucleotide for optimal eukaryotic expression. The ERK4 sequence was subsequently subcloned into EcoRI/NotI sites to generate pcDNA3-GST-ERK4 vector. pcDNA3-Flag-ERK4 was constructed by subcloning ERK4 into EcoRI/NotI sites of

pcDNA3-Flag. The pcDNA3-Flag vector was obtained by insertion of the Flag sequence between HindIII and EcoRI sites in pcDNA3. MK5 cDNA was obtained from ATCC (clone 10436456). MK5 coding sequence was subcloned into the EcoRI site of pcDNA3-Flag and pcDNA3-HA. MK5(1-423) construct was generated by PCR amplification of the full length MK5 cDNA introducing a stop codon at position 1269. MK5(1-423) was subcloned into the EcoRI/NotI sites of pcDNA3-Flag. The mutant constructs ERK4SA (S186A), ERK4KA (K49A/K50A), ERK4DA (D149A), MK5TA (T182A) and MK5KD (K51A) were generated using the Altered Sites *in vitro* mutagenesis system (Promega). His₆-MK5 wild type and KD recombinant proteins were constructed by subcloning the MK5 coding region (with stop codon) in frame into pHGST.1 (8). All mutations were confirmed by DNA sequencing. Sequence of the primers used for PCR and details about the cloning strategies are available upon request.

Cell culture and transfections

HEK 293, NIH 3T3 and Rat1 cells were cultured as described previously (10). HEK 293 and Rat1 cells were transfected using the calcium phosphate precipitation method and Eugene 6 (Roche Diagnostics), respectively. For stimulation experiments, cells were incubated overnight in serum-free medium 24 h after the transfection as described (18). The medium was changed 30 min prior to stimulation, and the cells were stimulated for the indicated times, washed in ice-cold PBS and frozen in liquid nitrogen until analysis. When indicated, protein kinase inhibitors were added 30 min prior to stimulation.

Protein biochemistry methods

His₆-MK5 construct was expressed into BL21 pLys(DE3) RIPL strain. The His₆-MK5 recombinant protein was bound on a HiTrap Chelating HP column (GE Healthcare) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM dithiothreitol (DTT) (buffer A), washed, and then eluted with buffer A supplemented with 250 mM imidazole on an AKTA FLPC system (GE Healthcare). The eluted fractions were dialyzed in buffer A at 4°C overnight. GST-Hsp27 was expressed from pGEX-Hu27 (kind gift of Dr Jacques Landry, Université Laval) into BL21 pLys(DE3) RIL strain and purified as described (8). Hsp27 was then cleaved from purified recombinant GST-Hsp27 with thrombin in buffer A. Protein purity and yield were evaluated by SDS-gel electrophoresis and Coomassie staining using bovine serum albumin as standard.

Cell lysis, immunoprecipitation and immunoblot analysis were performed as described (10, 30, 32). For immunoblotting, the chemiluminescent signal was analyzed either on film or by using a LAS3000 imaging system (Fuji). For immunoprecipitation, 750 μ g of lysate proteins were incubated with anti-HA (12CA5), anti-Myc (9E10) or anti-Flag antibody preadsorbed on protein A-agarose beads (GE Healthcare) for 2-4 h at 4°C. Immunoprecipitated proteins were detected by immunoblotting analysis.

For ERK3 kinase assays, transfected HEK 293 cells were treated with 10 μ M MG132 for 12 h before lysis. Coupled kinase assays were performed by incubation of immunoprecipitated ERK3 or ERK4 in MK5 kinase buffer (25 mM Hepes (pH 7.5), 25 mM MgCl_2 , 1 mM dithiothreitol) with 500 μ M ATP, 20 μ Ci ATP[$g^{32}\text{P}$], 5 μ g of recombinant His₆-MK5 and 2 μ g of Hsp27 at 30°C for 30 min. To measure the MK5 enzymatic activity associated with ERK3 or ERK4 (Fig. 7), the same protocol was used except that the ATP concentration was 50 μ M and no recombinant MK5 protein was added to the assay. The reactions were stopped by addition of loading buffer and the samples were analyzed by SDS-gel electrophoresis. Phosphorylated proteins were detected by phosphorimaging with a FLA5000 imaging system (Fuji).

In vivo ^{32}P i labeling, two-dimensional phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis were performed as described previously (4, 30, 32).

Immunofluorescence analysis

Immunofluorescence microscopy was performed as previously described (18). Briefly, Rat1 cells were seeded at 60,000 cells/well onto glass coverslips placed in 6-well plates, and transfected with expression plasmids (2.5 μ g DNA) as described above. The cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS for 20 min at 37°C. After quenching in 0.1 M glycine for 5 min, the cells were permeabilized by incubation in 0.1% Triton X-100 for 5 min at room temperature. Non specific sites were blocked in PBS, 1% bovine serum albumin for 60 min at 37°C. Staining was performed by incubating cells for 1 h at 37°C with anti-Myc and anti-Flag antibodies, followed by incubation with FITC-conjugated anti-rabbit IgG and rhodamine-conjugated anti-mouse IgG as respective secondary reagents. Cell preparations were viewed by fluorescence microscopy on a Leica DM IRB microscope.

Mass spectrometry analysis

Exponentially proliferating HEK 293 cells were transfected with pcDNA3-Myc₆-ERK3 or pcDNA3-Flag-ERK4. Cell lysates were prepared, and Myc₆-ERK3 or Flag-ERK4 were respectively immunoprecipitated with anti-Myc and anti-Flag antibody. The proteins were then separated by electrophoresis on SDS-acrylamide gels and the corresponding silver-stained bands were excised from the gel. The gel slices were reduced in 10 mM DTT for 1 h at 56°C followed by alkylation in 55 mM iodoacetamide for another hour at room temperature. After washing in 50 mM NH₄CO₃, the gel pieces were shrunk in 100% acetonitrile, and the proteins were digested with trypsin (Promega) in 50 mM NH₄CO₃ for 4 h at 37°C. The peptides were extracted in 90% acetonitrile/0.5 M urea and dried in a Speed Vac. The samples were solubilized in 5% acetonitrile, 0.2% formic acid and analyzed on a Waters Nanoacquity HPLC system coupled to a Q-TOF Premier mass spectrometer (Waters). Tryptic digests were first loaded on the pre-column at a flow rate of 4 ml/min and subsequently eluted from the analytical column using a gradient from 10 to 60% acetonitrile in 0.2 % formic acid over 56 min at 600 nl/min. Data base searches were performed against a non-redundant human IPI database using Mascot version 2.1 (Matrix Science).

Molecular modeling

Models of un-phosphorylated (1ERK) and phosphorylated (2ERK) rat ERK2 and un-phosphorylated human ERK3 (2I6L) were rendered using Swiss-PDB viewer v3.7.

RESULTS

ERK3 and ERK4 are phosphorylated *in trans* on Ser189 and Ser186, respectively, in their activation loop

To get insights into the regulation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4, we performed *in vivo* labeling experiments with ^{32}Pi to evaluate the phosphorylation status of the two kinases in proliferating cells. The expression of ectopic ERK3 is very weak due to a high turnover rate mediated by the ubiquitin-proteasome system (10). For labeling experiments, we used a Myc₆-tagged form of ERK3 to facilitate detection, as we recently showed that N-terminal ubiquitination of ERK3 is perturbed by addition of large N-terminal tags (9). As previously observed (6, 9), we found that ERK3 is a phosphoprotein *in vivo* (Fig. 1A). Phosphopeptide mapping analysis revealed that ERK3 is phosphorylated on 2 major peptides, and a number of minor sites, in exponentially proliferating HEK 293 cells (Fig. 1B). The phosphorylation of ERK3 does not depend on its own phosphotransferase activity. Indeed, the phosphorylation pattern of an ERK3 mutant in which lysine 49 and 50 of subdomain II are mutated to alanine (ERK3KA) is similar to that of the wild type protein (Fig. 1, A and B). Another catalytically inactive mutant of ERK3 (lacking the catalytic base Asp152 of subdomain VIB) is also phosphorylated to the same extent (data not shown). Phosphorylation of ERK3 is thus mediated *in trans* by an endogenous cellular kinase, possibly the ERK3 kinase previously characterized (6). In agreement with previous reports (6, 9, 10), we identified the activation loop residue Ser189 (spot 2) as one of the two major phosphorylation sites of ERK3 in asynchronously proliferating cells (Fig. 1B). The phosphorylation of ERK3 on Ser189 was further confirmed by mass spectrometry analysis (data not shown) and by immunoblotting analysis with a phospho-specific antibody to Ser189 (Fig. 1C). This antibody recognizes wild type and kinase-dead ERK3, but not the S189A mutant. By using a combination of phosphopeptide mapping and mass spectrometry analyses, we identified the other major phosphorylation site (spot 1) of ERK3 as Ser386 (Supplementary Fig. 1A and 1B).

ERK4 was also found to be phosphorylated in exponentially proliferating HEK 293 cells (Fig. 1A). Phosphopeptide maps of labeled ERK4 showed three main spots all containing phosphoserine residues (Fig. 1B and Supplementary Fig. 2). Mutation of the

activation loop Ser186 to Ala reduced the total incorporation of ^{32}P into ERK4 (Fig. 1A) and led to the disappearance of spot 1 on phosphopeptide maps (Fig. 1B), indicating that ERK4 is phosphorylated on Ser186 *in vivo*. Phosphorylation of Ser186 was further confirmed by mass spectrometry analysis (data not shown). Interestingly, Ser186 phosphorylation of ERK4 could also be detected using the anti-ERK3(Ser189) phospho-specific antibody (Fig. 1C). This antibody is thus referred to as a Ser189/186 phospho-specific antibody. As for ERK3, mass spectrometry analysis revealed that ERK4 is phosphorylated on Ser386 *in vivo* (Supplementary Fig. 1C).

Contrary to ERK3, activation loop phosphorylation of ERK4 depends in part on ERK4 kinase activity. The catalytically inactive mutant of ERK4 D149A is significantly less phosphorylated than the wild type protein on Ser186 (Fig. 1, B and C). However, the residual phosphorylation of the mutant on Ser186 indicates that ERK4 is also subject to activation loop phosphorylation by an unknown cellular kinase.

Phylogenetic analysis revealed that Ser189 and Ser186 are conserved in all vertebrate orthologs of ERK3 and ERK4 (Fig. 1D). The surrounding residues in the activation loop are also highly conserved, explaining the cross-reactivity of the anti-ERK3(Ser189) phospho-specific antibody. Ser189/Ser186 corresponds to threonine 185 in the MAP kinase ERK2 (Fig. 1D).

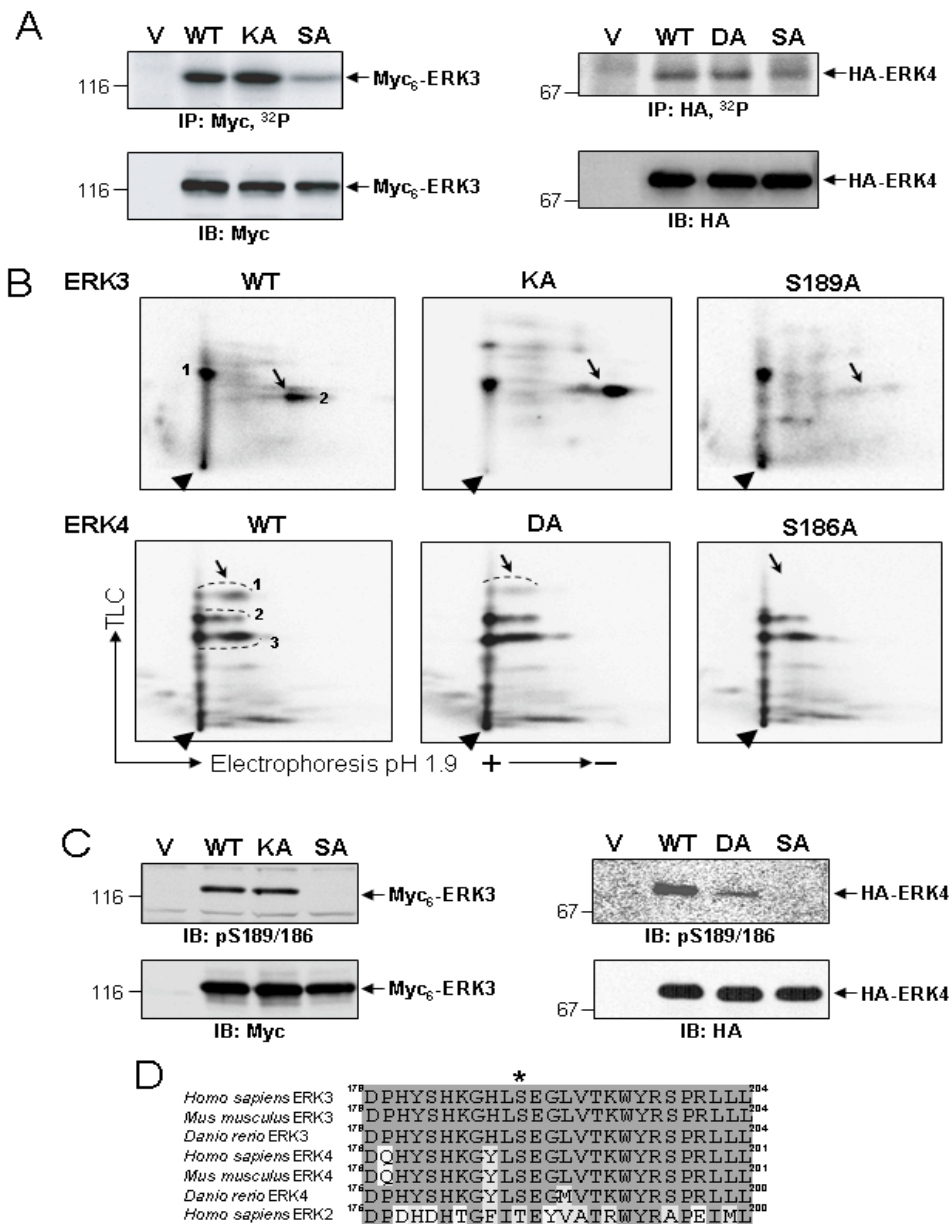


FIG. 1. ERK3 and ERK4 are phosphorylated *in trans* on Ser189 and Ser186 *in vivo*.

A: HEK 293 cells were transfected with empty vector (V) or with Myc₆-tagged wild type (WT), kinase-dead (KA, K49A/K50A) or S189A mutants of ERK3 (left panels), or HA-tagged wild type, catalytically inactive (DA, D149A) or S186A mutants of ERK4 (right panels). The cells were metabolically labeled with ³²Pi, and the ectopic ERK3 and ERK4 proteins were immunoprecipitated with anti-Myc and anti-HA antibody, respectively. Phosphorylation was detected by autoradiography (upper panels). The same membrane was analyzed for ERK3 and ERK4 expression by immunoblotting (lower panels). **B:** Phosphopeptide mapping analysis of ³²P-labeled ERK3 and ERK4 proteins purified as in A. Major phosphopeptides are numbered. The arrowhead indicates the position of sample application. Note the disappearance of spot 2 in ERK3 S189A mutant and spot 1 in ERK4 S186A mutant maps, respectively (arrows). **C:** HEK 293 cells were transfected with the indicated Myc₆-tagged ERK3 (left panels) or HA-tagged ERK4 (right panels) constructs. Total lysates from exponentially proliferating cells were analyzed by immunoblotting using S189/186 phospho-specific (upper panels) or Myc/HA (lower panels) antibodies. **D:** Sequence alignment of the activation loop residues surrounding Ser189 and Ser186 in different ERK3/ERK4 orthologs and human ERK2. Asterisk indicates phosphorylation.

Activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is not modulated by classical MAP kinase stimuli

Phosphorylation of the classical MAP kinases ERK1/ERK2, JNKs and p38s in the activation loop is acutely regulated by extracellular mitogenic and stress stimuli. We therefore examined the regulation of ERK3 and ERK4 activation loop phosphorylation by known MAP kinase stimuli such as serum, PMA, sorbitol and H₂O₂. Immunoblotting analysis with the Ser189/186 phospho-specific antibody revealed that ERK3 and ERK4 are detectably phosphorylated in the activation loop in unstimulated serum-starved cells and that treatment with strong mitogenic factors or cellular stresses does not further increase the extent of phosphorylation (Fig. 2A). More detailed kinetic analyses confirmed that phosphorylation of ERK3 and ERK4 on Ser189 and Ser186, respectively, is not appreciably modulated by serum or sorbitol, although a small reduction in ERK4 phosphorylation was noticed upon long term sorbitol exposure (Fig. 2, B and C). In sharp contrast, activating phosphorylation of the MAP kinases ERK1/ERK2, JNK or p38 was not detectable in serum-starved cells, but was strongly augmented upon serum or sorbitol stimulation. These results clearly indicate that the ERK3/ERK4 subfamily of MAP kinases is regulated very differently than classical family members.

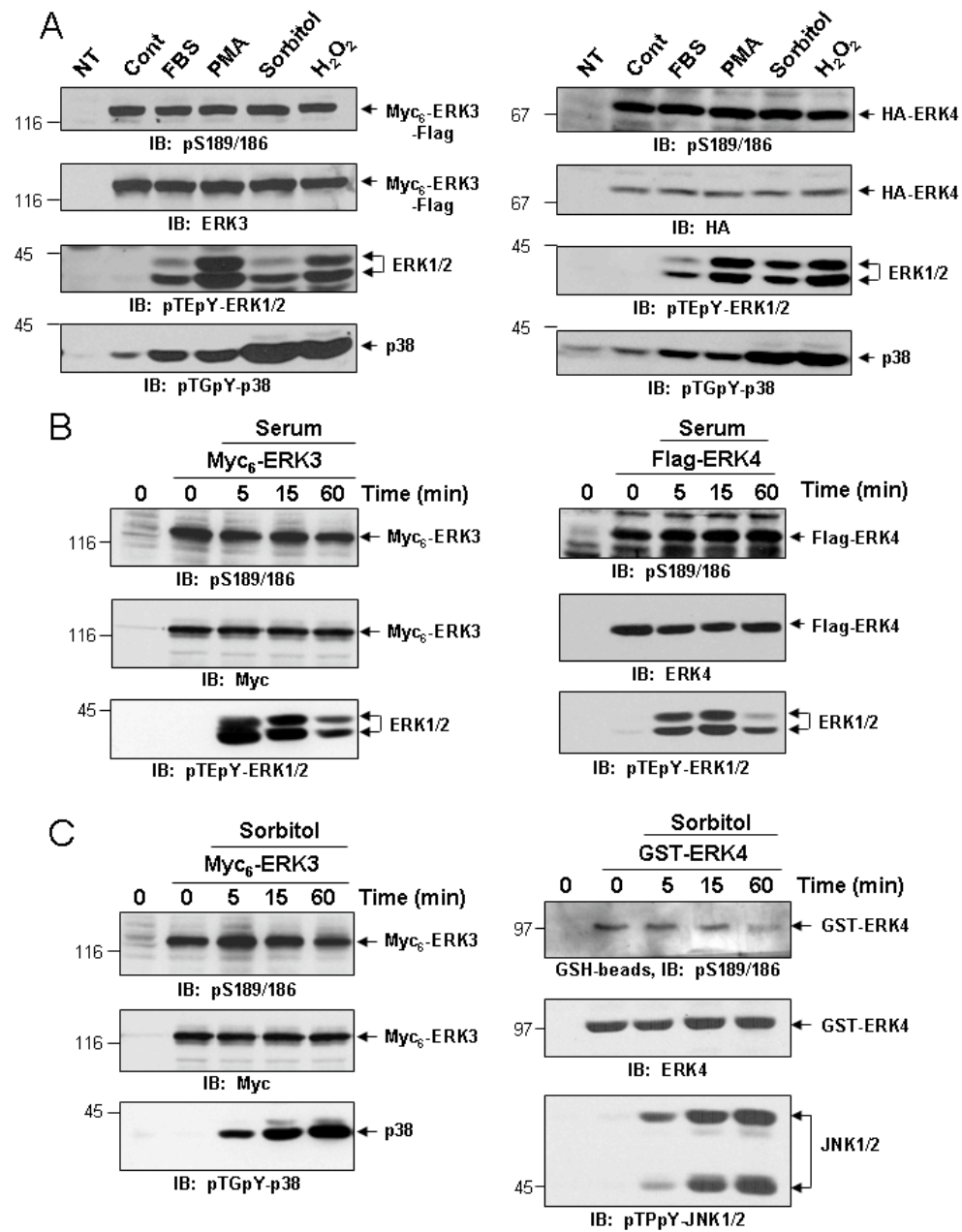


FIG. 2. Common mitogenic or stress stimuli do not modulate activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4.

A: HEK 293 cells were transfected with Myc₆-ERK3-Flag or HA-ERK4 and serum-starved overnight. Quiescent cells were then stimulated or not (Cont) with 10% fetal bovine serum (FBS), 200 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 400 mM sorbitol, or 2 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) for 10 min. The phosphorylation of ERK3/ERK4 on Ser189/Ser186 (upper panel), the total expression of ERK3 and ERK4 (middle panel), and the activation loop phosphorylation of ERK1/ERK2 or p38 (lower panels) was analyzed by immunoblotting. NT, non transfected. **B:** HEK 293 cells were transfected with either Myc₆-ERK3 or Flag-ERK4. The cells were made quiescent by serum deprivation, and then stimulated with 10% calf serum for the indicated times. Total cell lysates were analyzed by immunoblotting as described above. **C:** Same as in B, except that cells were stimulated with 400 mM sorbitol. The activation loop phosphorylation of p38 (lower left panel) and JNK (lower right panel) was monitored by immunoblotting.

The stoichiometry of ERK3/ERK4 activation loop phosphorylation can be indirectly increased by MK5 interaction

Recent studies have shown that MK5, in addition to being a substrate of ERK3/ERK4, can reciprocally act as a kinase and phosphorylate ERK3 and ERK4 both *in vitro* and *in vivo* (19, 31, 33), suggesting a complex relationship between these protein kinases. To analyze the impact of MK5 on ERK3 and ERK4 activation loop phosphorylation, we co-transfected the two kinases in HEK 293 cells and monitored the phosphorylation of ERK3 on Ser189 or of ERK4 on Ser186. As previously reported (19), overexpression of MK5 resulted in hyper-phosphorylation of ERK4 as revealed by the presence of a slower migrating band on SDS-acrylamide gels (Fig. 3A, middle panel). Co-expression of catalytically inactive MK5 with ERK4 or expression of catalytically inactive ERK4 with MK5 failed to induce this mobility shift, indicating that ERK4 hyper-phosphorylation is dependent on both MK5 and ERK4 kinase activities. The ERK4 S186A mutant was also hyper-phosphorylated when co-expressed with MK5, although the mobility shift was only partial compared to the wild type protein.

Interestingly, co-expression of MK5 significantly increased the phosphorylation of both ERK4 and ERK3 in the activation loop (Fig. 3A and 4A, upper panel). This augmented phosphorylation was shown to be completely independent of the catalytic activities of MK5 and of ERK3/ERK4. Analysis of ERK3 Ser189 and ERK4 Ser186 phosphorylation (Fig. 3A and 4A, upper panel) and total ERK3/ERK4 levels (Fig. 3A and 4A, middle panel) suggested that the increase in Ser189 and Ser186 phosphorylation is mainly due to a change in phosphorylation stoichiometry rather than a change in protein abundance. However, unlike ERK3, ERK4 can be detected as two distinct bands on gels, which complicates the quantitative assessment of its phosphorylation. To further address this question, we monitored Ser186 phosphorylation of ERK4 at increasing concentrations of MK5. These experiments convincingly showed that activation loop phosphorylation of wild type ERK4 and D149A mutant increases proportionally with the amount of MK5 without any major change in ERK4 protein abundance (Fig. 3B), thus confirming that MK5 expression increases the stoichiometry of ERK3/ERK4 activation loop phosphorylation.

To determine whether the increase in ERK3 Ser189 and ERK4 Ser186 phosphorylation was dependent on MK5 interaction, we co-transfected a truncated form of MK5 (amino acids 1 to 423), which lacks the region required for ERK3/ERK4 interaction but still possesses kinase activity (1). Expression of MK5(1-423) failed to increase ERK3 and ERK4 activation loop phosphorylation (Fig. 3C and 4B). Together, these results suggest that MK5 interaction favors the recruitment of an activating ERK3/ERK4 kinase into the complex.

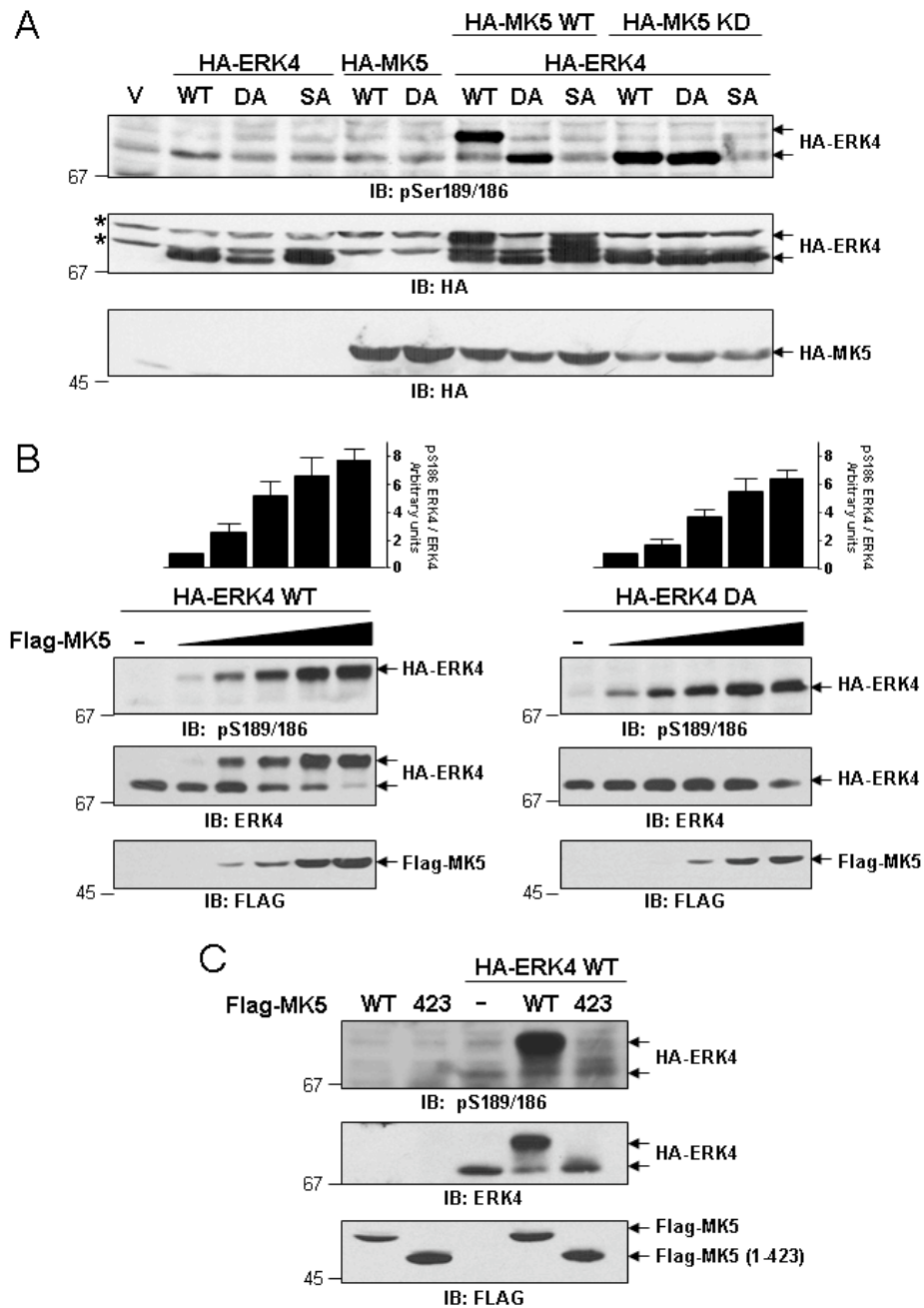


FIG. 3. Overexpression of MK5 increases the phosphorylation of ERK4 on Ser186.

A and C: HEK 293 cells were transfected with HA- or Flag-tagged MK5 WT, KD or the truncated 1-423 mutant (423) together with the indicated HA-ERK4 constructs. After 48 h, the phosphorylation of ERK4 on Ser186 (upper panel), and the total expression of ERK4 (middle panel) and MK5 (lower panel) were analyzed by immunoblotting. (*)non-specific bands **B:** HEK 293 cells were transfected with increasing amounts of Flag-MK5 in the presence of HA-ERK4 WT (left panel) or HA-ERK4 DA (right panel). Cell lysates were analyzed as above. The bar histograms represent the ratio of phosphorylated ERK4 to total ERK4 quantified from three independent experiments.

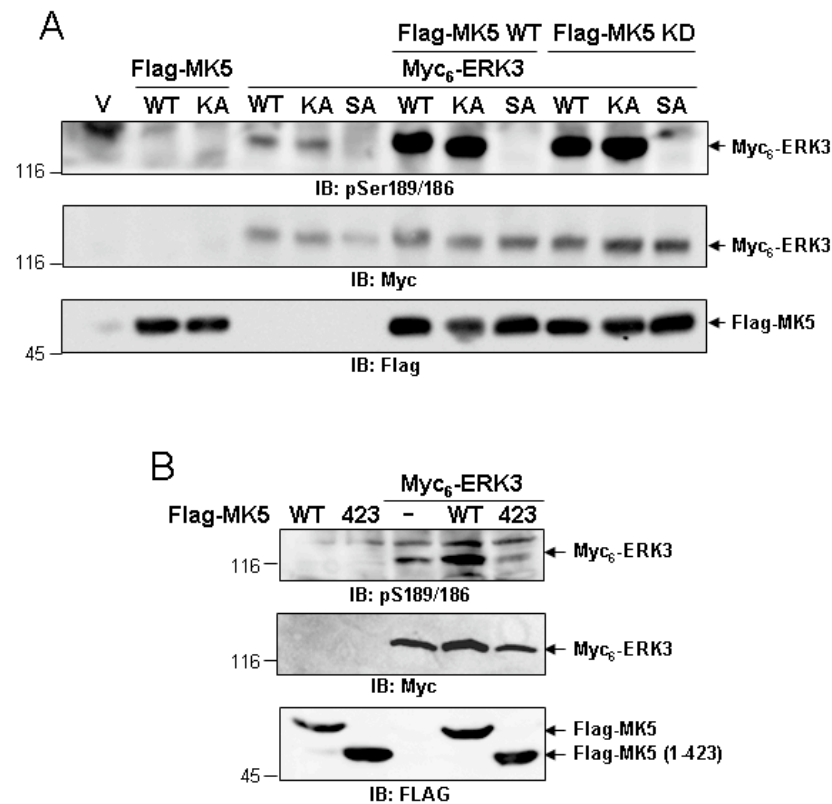


FIG. 4. Overexpression of MK5 increases phosphorylation of ERK3 on Ser189.

A and B: HEK 293 cells were transfected with Flag-tagged MK5 WT, KD or the truncated 1-423 mutant (423) together with the indicated Myc₆-ERK3 constructs. After 48 h, the phosphorylation of ERK3 on Ser189 (upper panel), and the total expression of ERK3 (middle panel) and MK5 (lower panel) were analyzed by immunoblotting.

Activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is essential for optimal MK5 activation

To analyze the impact of activation loop phosphorylation on the activity of ERK3 and ERK4, we measured the ability of the two kinases to activate MK5 in an *in vitro* coupled kinase assay. For these experiments, Myc₆-tagged wild type or mutant ERK3 were transiently expressed in HEK 293 cells, immunoprecipitated, and incubated with purified recombinant wild type or inactive MK5 in the presence of Hsp27 as substrate. As shown in Fig. 5A, wild type ERK3 immunoprecipitated from exponentially proliferating HEK 293 cells strongly activated MK5 as revealed by the robust phosphorylation of its substrate Hsp27. Little or no phosphorylation of Hsp27 was detected in the absence of MK5, confirming that ERK3 acts directly on MK5. The two catalytically inactive mutants of ERK3 K49A/K50A and D152A failed to activate MK5, indicating that direct phosphorylation of MK5 is required for its enzymatic activation. Likewise, the S189A

activation loop mutant of ERK3 was unable to stimulate the activity of MK5 *in vitro* (Fig. 5A).

Similar results were obtained with ERK4 (Fig. 5B). Notably, ERK4 S186A mutant partially activated MK5 in this assay, suggesting that ERK4 possesses residual kinase activity in the absence of Ser186 phosphorylation. Nevertheless, phosphorylation of Ser186 strongly enhanced ERK4 activity. Altogether, these data demonstrate that activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for full kinase activity and subsequent MK5 activation.

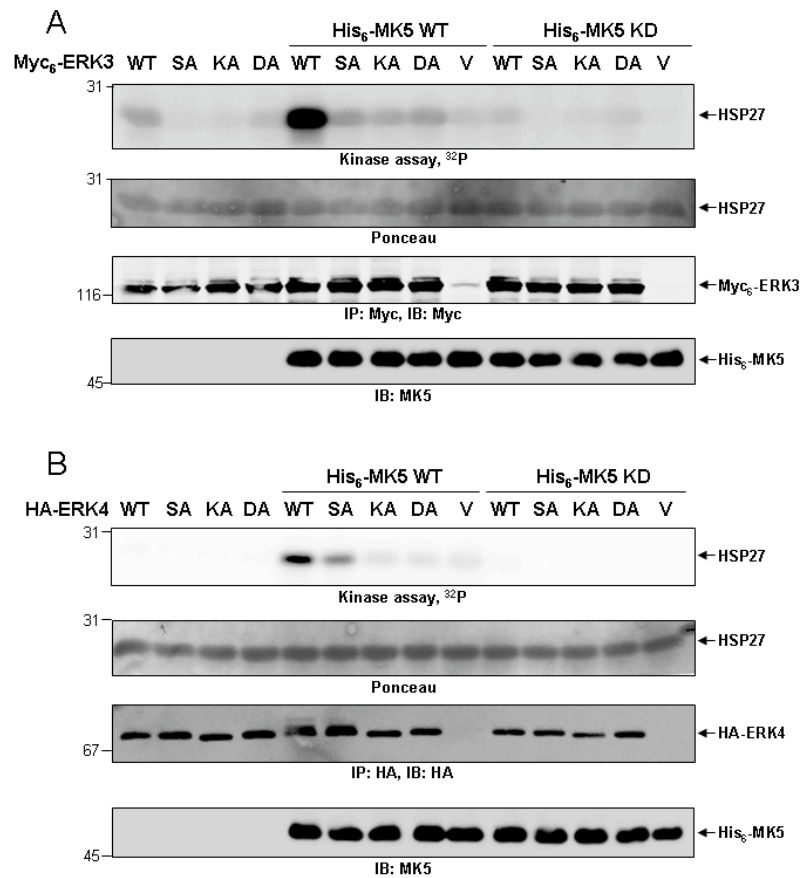


FIG. 5. Activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is essential for optimal MK5 activation *in vitro*.

A: HEK 293 cells were transfected with the indicated Myc₆-tagged ERK3 constructs. After 24 h, the cells were treated with 10 μ M MG132 for 12 h, and ERK3 was immunoprecipitated with anti-Myc antibody. Enzymatic activity was measured in a coupled kinase assay by incubation of ERK3 with recombinant His₆-MK5 (wild type (WT) or kinase-dead (KD)) and Hsp27 in the presence of ATP[³²P]. The reaction products were analyzed by autoradiography (upper panel) and immunoblotting of the indicated proteins. The amount of Hsp27 was normalized by Ponceau staining of the membrane. **B:** Same as above, except that HEK 293 cells were transfected with the indicated HA-tagged ERK4 constructs. After 36 h, ERK4 was immunoprecipitated with anti-HA and enzymatic activity was assayed as in A.

Phosphorylation of ERK3 and ERK4 in the activation loop allows for stable interaction with their substrate MK5

We then evaluated the impact of Ser189/186 phosphorylation on complex formation between ERK3/ERK4 and MK5. Co-immunoprecipitation experiments confirmed that both ERK3 and ERK4 interact with MK5 in a kinase-independent manner (Fig. 6, A and B) (1, 19, 31, 33). Strikingly, activation loop mutants of ERK3 and ERK4 were found to interact poorly with MK5 (Fig. 6, A and B). In contrast, interaction of ERK4 with MK5 is not influenced by the phosphorylation of MK5 activation loop (Fig. 6C).

We next measured the MK5 activity associated with ERK3 and ERK4 in cells. Immunoprecipitates of ERK3 and ERK4 co-expressed with MK5 display high phosphotransferase activity towards Hsp27 (Fig. 7, A and B). Co-transfection with an inactive MK5 mutant abolishes this activity, confirming that MK5 is responsible for the observed Hsp27 phosphorylation. Contrary to the results of *in vitro* coupled kinase assays (Fig. 5A), expression of catalytically inactive mutants of ERK3 induced a partial activation of the physically-associated MK5 (Fig. 7A). This kinase-independent activity is likely due to the scaffolding action of ERK3 as postulated by Schumacher *et al.* (31). Importantly, the S189A and S186A mutants of ERK3 and ERK4, respectively, were completely devoided of associated MK5 activity (Fig. 7, A and B), in agreement with the results of co-immunoprecipitation experiments (Fig. 6). Thus, in addition to stimulating their intrinsic catalytic activity, activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is important for the formation of active ERK3/ERK4-MK5 complexes.

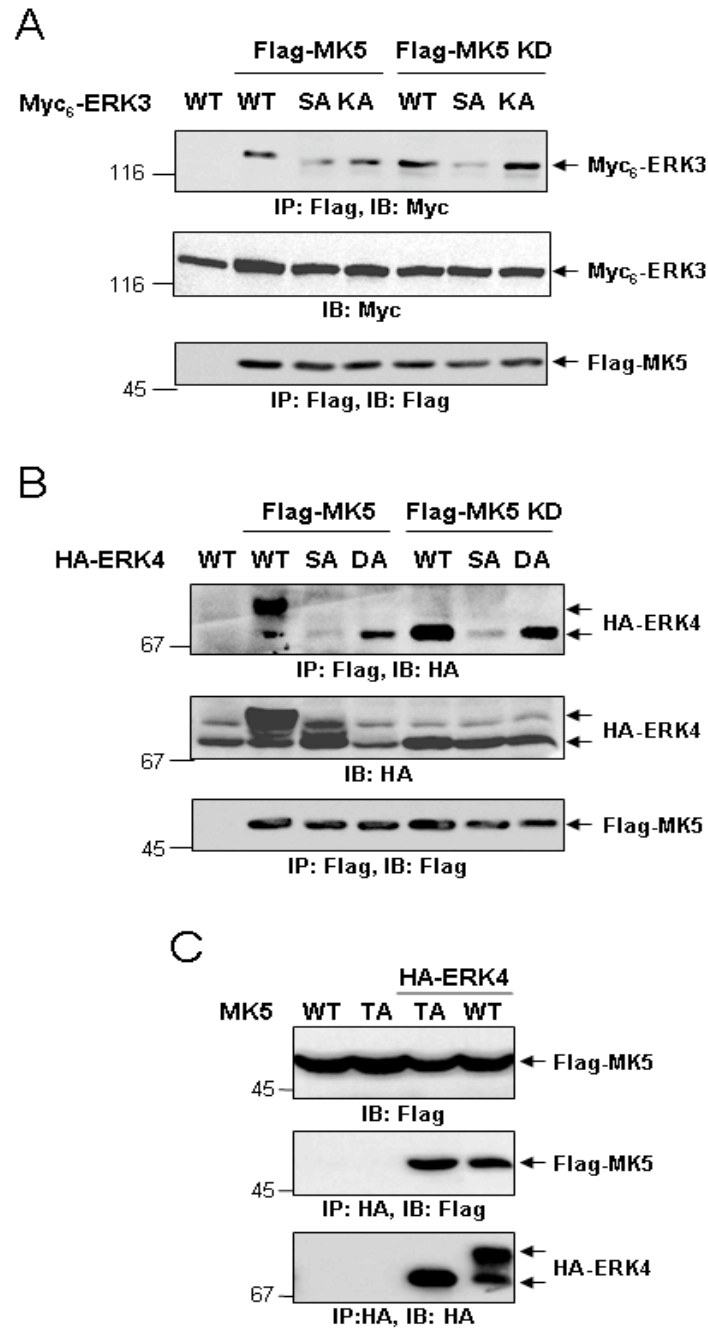


FIG. 6. Activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is required for their stable interaction with MK5 *in vivo*.

A and B: HEK 293 cells were transfected with the indicated Myc₆-ERK3 or HA-ERK4 constructs together with wild type or kinase-dead Flag-MK5. After 36 h, the cells were lysed and MK5 was immunoprecipitated with anti-Flag antibody. Total lysates and Flag immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with antibodies to Myc, HA and Flag epitopes. **C:** HEK 293 cells were transfected with the indicated expression plasmids. After 36 h, cells were lysed and ERK4 was immunoprecipitated with anti-HA antibody. Total lysates and HA immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with appropriate antibodies.

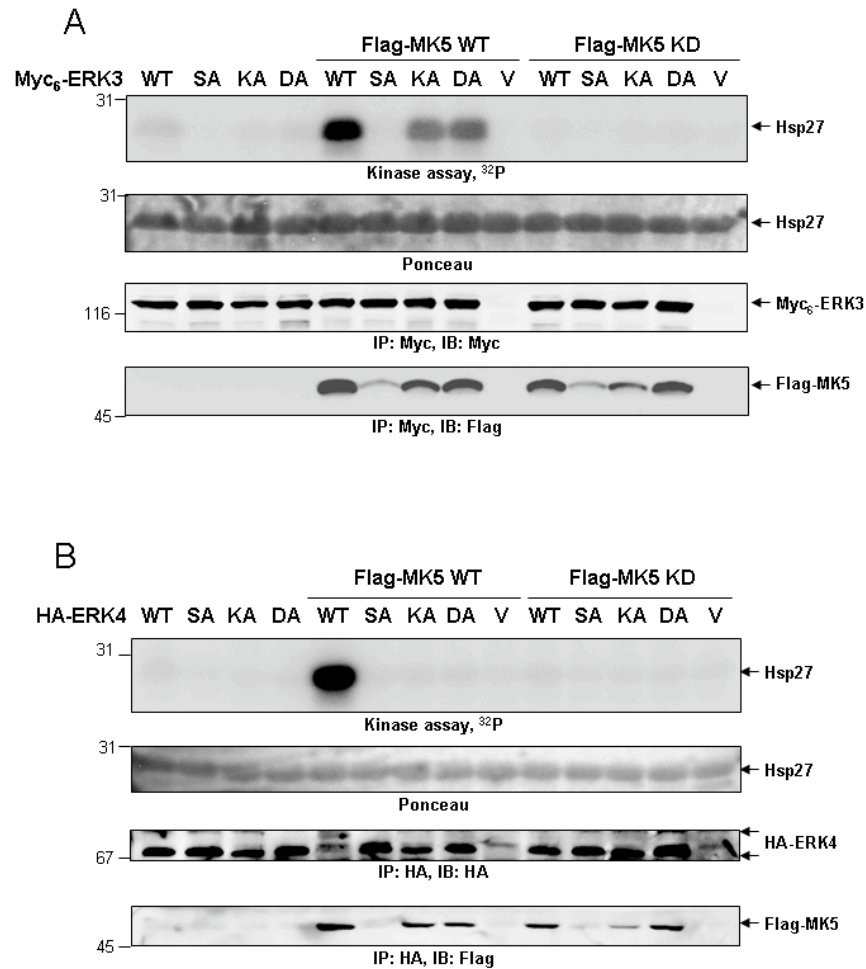


FIG. 7. Activation loop phosphorylation allows the formation of active ERK3/ERK4-MK5 complexes *in vivo*.

A: HEK 293 cells were transfected with the indicated Myc₆-tagged ERK3 and Flag-tagged MK5 constructs. After 24 h, the cells were treated with 10 μ M MG132 for 12 h, and ERK3 was immunoprecipitated with anti-Myc antibody. Enzymatic activity was measured by incubation of ERK3 with Hsp27 in the presence of ATP[³²P]. The reaction products were analyzed by autoradiography (upper panel) and immunoblotting of the indicated proteins. Hsp27 was normalized by Ponceau staining of the membrane. **B:** Same as above, except that HEK 293 cells were transfected with the indicated HA-tagged ERK4 constructs. After 36 h, ERK4 was immunoprecipitated with anti-HA and enzymatic activity was assayed as in A.

The nucleocytoplasmic distribution of ERK3/ERK4-MK5 complexes is regulated by activation loop phosphorylation

Co-expression of ERK3 with MK5 has been reported to induce the cytoplasmic relocation of MK5 (31) or of both MK5 and ERK3 (33) in various cell types. Similarly, ERK4 expression with MK5 causes the nuclear-to-cytoplasmic redistribution of MK5 (1, 19). Given the importance of Ser189 and Ser186 phosphorylation for the interaction of

ERK3 and ERK4 with MK5, we asked whether this phosphorylation event influences the subcellular localization of ERK3/ERK4-MK5 complexes. For these experiments, MK5 and wild type or mutant ERK3 were transiently expressed in Rat1 cells, and the cellular localization of the two kinases was visualized by immunofluorescence microscopy. As previously reported (18, 33), ERK3 and MK5 when expressed alone localize mainly in the nucleus, while their co-expression induces the relocation of both kinases in the cytoplasm (Fig. 8). The catalytically inactive mutant of ERK3 D152A was similarly relocated to the cytoplasm by MK5. However, ERK3 S189A mutant was less efficiently redistributed to the cytoplasm than the wild type protein (Fig. 8B). In these assays, no apparent difference in the localization of MK5 could be observed upon co-expression with the different ERK3 mutants (Fig. 8A). The reason for this is unclear. It is possible that an inappropriate stoichiometry between the two expressed proteins results in a lack of sensitivity of our assay. Nevertheless, the effect of the Ser189 mutation on the cytoplasmic redistribution of ERK3 by MK5 suggests that activation loop phosphorylation is important for the subcellular localization of ERK3-MK5 complexes.

Unlike ERK3, ERK4 is mainly found in the cytoplasmic compartment of most cell types (Fig. 9 and (1)). This explains why we do not observe a cytoplasmic redistribution of the kinase upon co-expression of MK5 (Fig. 9A). On the other hand, co-expression of wild type or catalytically inactive ERK4 leads to a quantitative redistribution of MK5 from the nucleus to the cytoplasm (Fig. 9B). Mutation of Ser186 of ERK4 markedly impairs the cytoplasmic relocation of MK5. The more efficient subcellular redistribution of MK5 mediated by ERK4 compared to ERK3 could be explained in part by the fact that ERK4 is more stable than ERK3 (1, 10, 19). We conclude that activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is necessary for their stable association with MK5 and, as a consequence, for the redistribution of ERK3/ERK4-MK5 complexes to the cytoplasm.

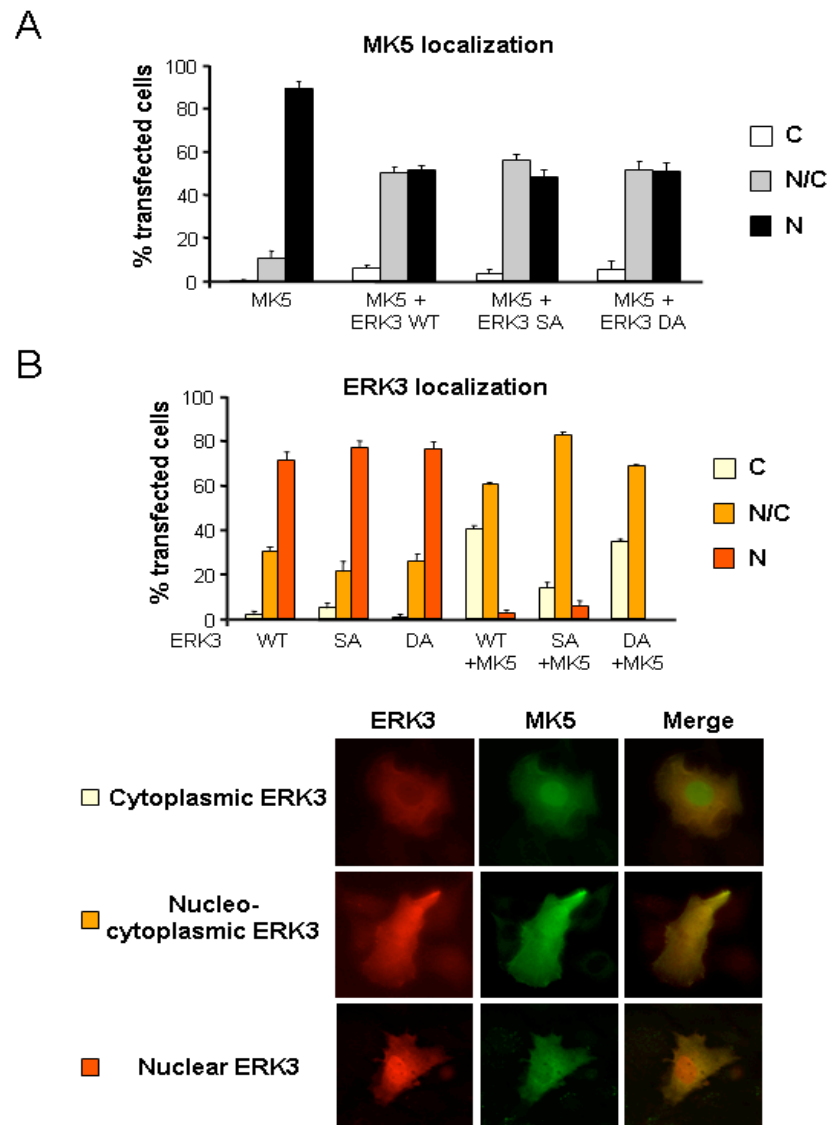


FIG. 8. The cytoplasmic redistribution of ERK3 induced by MK5 depends in part on Ser189 phosphorylation.

A and B: Rat1 cells were transfected with the indicated Myc₆-tagged ERK3 and Flag-tagged MK5 constructs. After 48 h, the cells were fixed and the subcellular localization of ERK3 and MK5 was visualized by fluorescence microscopy after double staining with anti-Myc and anti-Flag antibodies. For each condition, at least 100 cells co-expressing ERK3 and MK5 were scored as follow: cells showing predominant cytoplasmic (C), uniform nuclear and cytoplasmic (N/C) or predominant nuclear (N) staining. Bar graphs represent the mean \pm SEM of three independent experiments. A representative example of the different subcellular localization patterns of ERK3 is shown.

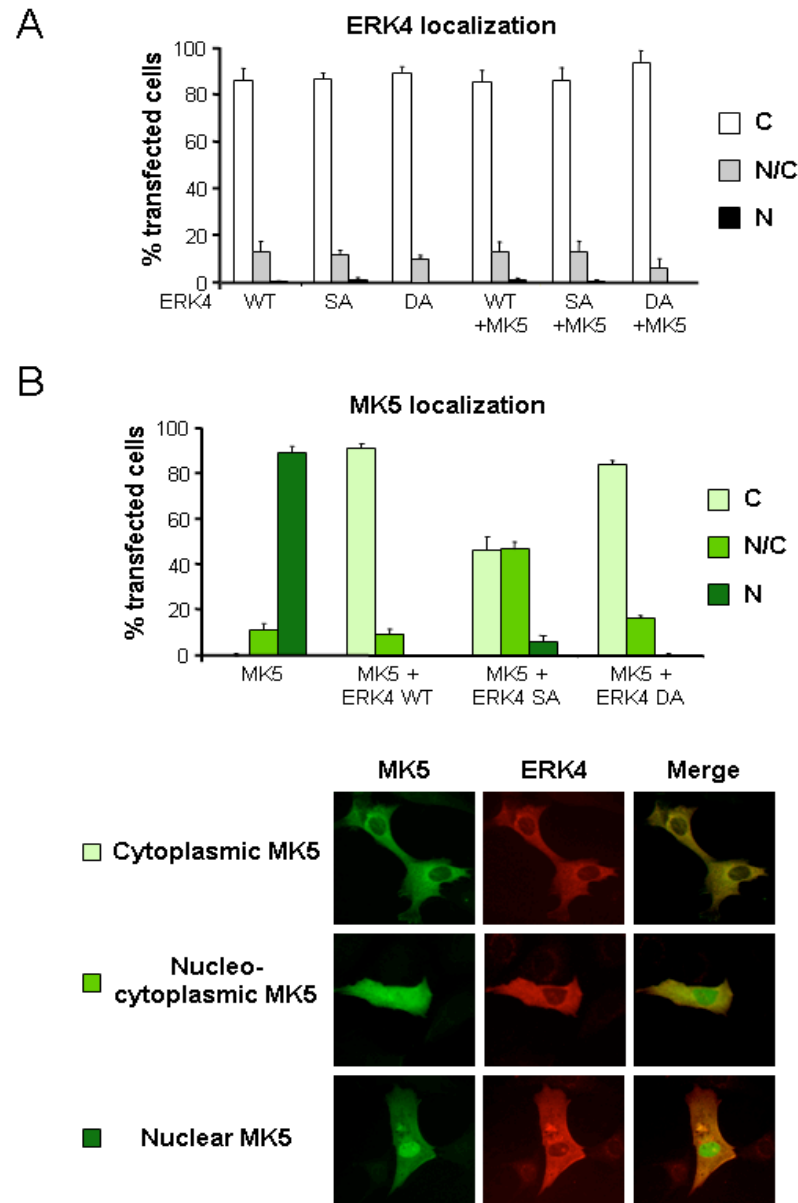


FIG. 9. Ser186 phosphorylation of ERK4 is required for efficient cytoplasmic relocation of MK5.

A and **B**: Rat1 cells were transfected with the indicated HA-tagged ERK4 and Flag-tagged MK5 constructs. After 48 h, the cells were fixed and the subcellular localization of ERK4 and MK5 was visualized by fluorescence microscopy after double staining with anti-HA and anti-Flag antibodies. The data were analyzed and expressed as in Fig. 8. A representative example of the different subcellular localization patterns of MK5 is shown.

DISCUSSION

The enzymatic activity of classical MAP kinases is controlled by reversible phosphorylation of the activation loop. In this study, we show that the ERK3 subfamily of atypical MAP kinases, which consist of ERK3 and ERK4, is also subject to regulation by activating loop phosphorylation *in vivo*. ERK3 and ERK4 possess the sequence Ser-Glu-Gly in their activation loop instead of the conserved Thr-Xxx-Tyr motif found in classical MAP kinases (7). Like other MAP kinases, ERK3 and ERK4 are phosphorylated on this motif in intact cells (this study; (6, 9, 10)). Interestingly, *in vivo* labeling experiments and immunoblotting analysis with a phospho-specific antibody to Ser189/186 revealed that phosphorylation of ERK3 and ERK4 in the activation loop is constitutive in resting cells. No change in the extent of Ser189/Ser186 phosphorylation of ERK3/ERK4 was observed upon stimulation of quiescent cells by potent mitogenic or stress stimuli. In contrast, the same treatments induced a robust activation of the classical MAP kinases ERK1/2, JNK and p38. These results indicate that ERK3 and ERK4 are regulated differently than classical MAP kinases.

Interestingly, we observed that MK5 expression indirectly increases the stoichiometry of phosphorylation of ERK3/ERK4 in the activation loop. This increase is independent of the catalytic activity of both MK5 and ERK3/ERK4, suggesting that the physical association of ERK3/ERK4-MK5 complexes may facilitate the recruitment and/or activation of the ERK3/ERK4 activation loop kinase. This mechanism may create a positive feedback loop to enforce MK5 activation. The physiological relevance of this observation requires further investigation.

Our findings confirm that phosphorylation of ERK3 on Ser189 is exerted *in trans* by one or more cellular kinases, which may correspond to a previously characterized and partially purified ERK3-kinase activity (6). On the other hand, activation loop phosphorylation of ERK4 appears to depend both on autophosphorylation and on phosphorylation by a cellular kinase. The identity of the ERK3 and ERK4 kinase(s) is unknown. To get initial insight into the signaling pathways involved in the control of ERK3 and ERK4 activation loop phosphorylation, we have treated cells with pharmacological inhibitors of the following protein kinases: MEK1/2, JNK, p38, phosphatidylinositol-3-OH

kinase, protein kinase C and protein kinase A. No significant change in the activation loop phosphorylation of ERK3 or ERK4 was observed upon inhibition of these signaling pathways (Supplementary Fig. 3). The observation that ERK3 and ERK4 are phosphorylated in all cellular conditions tested, including growth-arrested and terminally differentiated cells, suggest that ERK3 and ERK4 activation loop kinases are constitutively active in most cellular contexts and may represent a single protein kinase.

Some activation loop kinases are known to be constitutively active. The cyclin-dependent kinase activating kinase (CAK) is responsible for phosphorylation of the conserved threonine residue present in the activation loop of the cell cycle kinases Cdk1, Cdk2 and Cdk4/6. Studies indicate that CAK is active in all phases of the cell cycle and is therefore not limiting for cyclin-dependent kinase activation (34). Activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 could result from the basal activity of a highly expressed ERK3/ERK4 kinase(s). As suggested by Dummer *et al.* (12), the basal activity of ERK1/ERK2 is sufficient to activate RSK4 in the absence of extracellular stimulation. For certain protein kinases, activation loop phosphorylation is necessary but not sufficient to induce full activation of the enzyme. Phosphorylation of a second site or protein-protein interactions is necessary. In the case of ERK3 and ERK4, interaction with MK5 and/or phosphorylation induced by MK5 could represent an additional regulatory step leading to their activation.

Our results clearly demonstrate the positive regulatory role of Ser189/Ser186 phosphorylation on the kinase activity of ERK3/ERK4. Recently, the crystal structure of the unphosphorylated ERK3 kinase domain was solved (13). This structure helps explain the lack of activity of ERK3 S189A mutant. The non-phosphorylated ERK3 is found in an open conformation, often observed in inactive protein kinases (16, 25) (Supplementary Fig. 4A). Moreover, the activation loop of non-phosphorylated ERK3 blocks access to the active site (Supplementary Fig. 4B). The fact that ERK4 S186A mutant displays partial kinase activity suggests that the configuration of its activation loop differs from that of ERK3, despite the high degree of amino acid conservation between the two kinases.

Previous studies have shown that physical interaction, but not kinase activity, is important for the nuclear-to-cytoplasmic redistribution of MK5 by ERK3 and ERK4. A

motif between amino acids 330 to 340 of ERK3/ERK4 was shown to be essential for this phenomenon (33). The results presented here now reveal a role of ERK3/ERK4 activation loop phosphorylation in regulating the subcellular localization of ERK3/ERK4-MK5 complexes. This effect is most likely a consequence of the stabilizing effect of Ser189/Ser186 phosphorylation on the physical association between ERK3/ERK4 and MK5. A subset of ERK1/ERK2 substrates preferentially associates with the dually phosphorylated kinases (23). These substrates are characterized by the presence of a DEF domain, which interacts with a hydrophobic patch located on the C-terminal lobe of the kinase, near the activation loop (17). In fact, the activation loop partially masks the FxFP binding site in the non-phosphorylated ERK2 structure (23). Pull-down experiments have revealed that phosphorylated ERK2 has 3 times more affinity to FxFP-containing Elk1 than the non-phosphorylated kinase. Our results suggest that phosphorylated ERK3 and ERK4 interact ~10 times more efficiently with MK5 than the S189A/S186A mutants. Similarly to other MAP kinases, ERK3 and ERK4 could preferentially associate with their substrates (e.g. MK5) in the phospho-Ser189/186 form via a specific binding interface. Alternatively, MK5 might directly contact the phosphorylated activation loop segment.

The results of the present study can be summarized in the following model (Fig. 10). MK5 has low affinity for and interacts transiently with unphosphorylated ERK3/ERK4. This interaction recruits and/or contributes to the activation of ERK3/ERK4 activation loop kinase, which catalyzes the phosphorylation of Ser189/Ser186. Once this phosphorylation step has occurred, the ERK3/ERK4-MK5 interaction is strengthened, ERK3/ERK4 is activated and subsequently phosphorylates MK5 on its own activation loop (1). Phosphorylation of MK5 on Thr182 fully activates the kinase and induces the phosphorylation of ERK3/ERK4 outside of the activation loop. The two activated kinases are then competent to phosphorylate additional physiological substrates and relay the signal downstream. The identity and regulatory impact of MK5 phosphorylation sites on ERK3/ERK4 remain to be established. In the course of these studies, we have identified Ser386 as a novel phosphorylation site in both ERK3 and ERK4 (Supplementary Fig. 1). Interestingly, the conserved Ser386 residue lies in a putative MK5 consensus sequence (14). Further experiments are needed to clarify the role and regulation of this phosphorylation site.

During the revision of this manuscript, Perander et al. published a study in which they reported similar findings on the role of Ser186 of ERK4 (27).

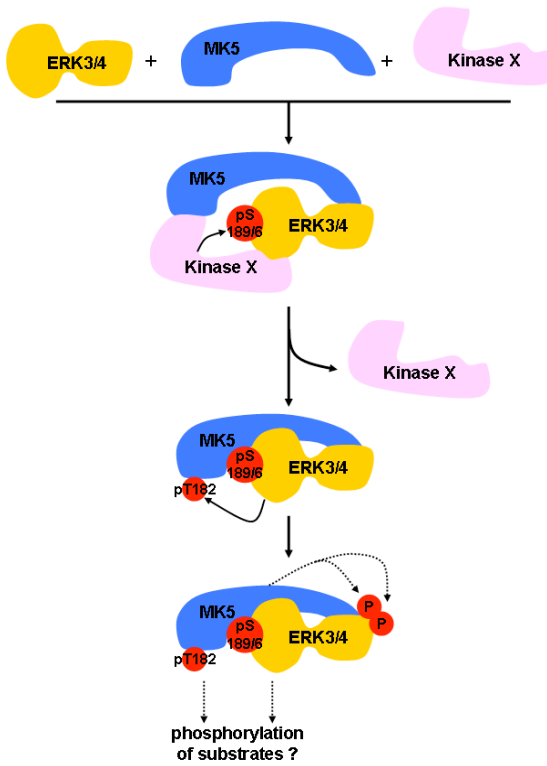


FIG. 10. Model of the activation of ERK3/ERK4-MK5 complexes.

See text for detail

ACKNOWLEDGMENTS

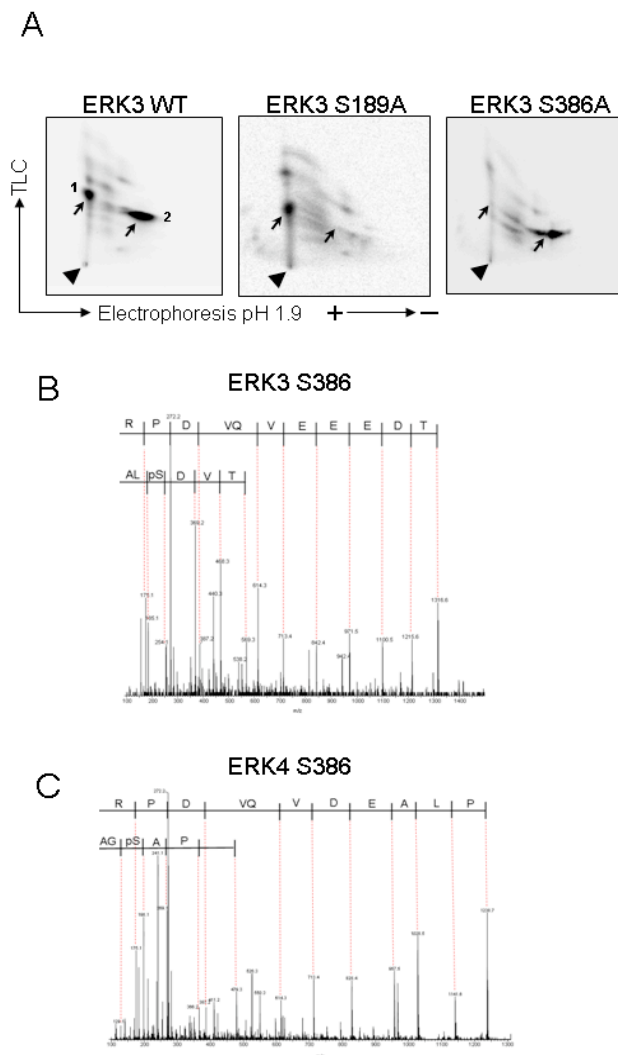
We thank E. Bonneil and P. Thibault from IRIC proteomic facility for mass spectrometry analysis. We thank R. Davis, G. Sauvageau, M. Servant, T. Hoang, K. Borden and J. Landry for reagents and I. Topisirovic for technical help. We also thank the following institutions for studentship and fellowship support: Fonds de la Recherche en Santé du Québec (P.D.); Fondation pour la Recherche Médicale (P.D.); National Cancer Institute of Canada (P.C. and G.R.); American Association for Cancer Research (G.R.); and Canadian Institutes for Health Research (P.L.T.). S.Meloche holds the Canada Research Chair in Cellular Signaling.

REFERENCES

1. **Aberg, E., M. Perander, B. Johansen, C. Julien, S. Meloche, S. M. Keyse, and O. M. Seternes.** 2006. Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* **281**:35499-510.
2. **Anhe, G. F., A. S. Torrao, T. C. Nogueira, L. C. Caperuto, M. E. Amaral, M. C. Medina, A. K. Azevedo-Martins, A. R. Carpinelli, C. R. Carvalho, R. Curi, A. C. Boschero, and S. Bordin.** 2006. ERK3 associates with MAP2 and is involved in glucose-induced insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* **251**:33-41.
3. **Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb, and G. D. Yancopoulos.** 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**:663-75.
4. **Boyle, W. J., P. van der Geer, and T. Hunter.** 1991. Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol* **201**:110-49.
5. **Canagarajah, B. J., A. Khokhlatchev, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**:859-69.
6. **Cheng, M., E. Zhen, M. J. Robinson, D. Ebert, E. Goldsmith, and M. H. Cobb.** 1996. Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3. *J Biol Chem* **271**:12057-62.
7. **Coulombe, P., and S. Meloche.** 2007. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**:1376-87.
8. **Coulombe, P., and S. Meloche.** 2002. Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins. *Anal Biochem* **310**:219-22.
9. **Coulombe, P., G. Rodier, E. Bonneil, P. Thibault, and S. Meloche.** 2004. N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* **24**:6140-50.
10. **Coulombe, P., G. Rodier, S. Pelletier, J. Pellerin, and S. Meloche.** 2003. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* **23**:4542-58.
11. **Crowe, D. L.** 2004. Induction of p97MAPK expression regulates collagen mediated inhibition of proliferation and migration in human squamous cell carcinoma lines. *Int J Oncol* **24**:1159-63.
12. **Dummler, B. A., C. Hauge, J. Silber, H. G. Yntema, L. S. Kruse, B. Kofoed, B. A. Hemmings, D. R. Alessi, and M. Frodin.** 2005. Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types. *J Biol Chem* **280**:13304-14.
13. **Filippakopoulos, P., Turnbull, A.P., Savitsky, P., Fedorov, O., Berridge, G., Das, S., Elkins, J., Soundararajan, M., Yang, X.W., Doyle, D., Papagrigoriou, E., Pike, A.C.W., Bunkoncz, G., Ugochukwu, E., Debreczeni, J., von Delft, F., Edwards, A., Arrowsmith, C., Sundstrom, M., Knapp, S.** 2006, posting date. Crystal structure of human mitogen activated protein kinase 6 (MAPK6) [Online.]

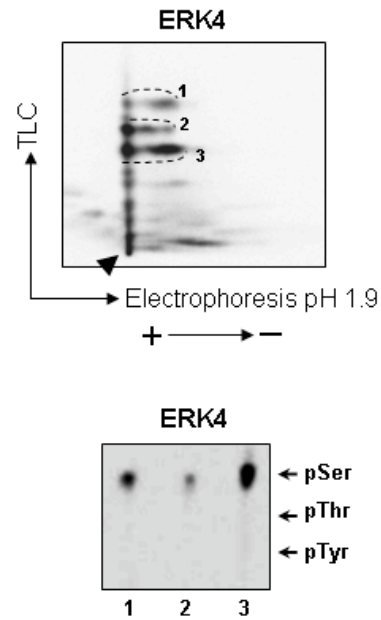
14. **Gaestel, M.** 2006. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:120-30.
15. **Hoeflich, K. P., M. T. Eby, W. F. Forrest, D. C. Gray, J. Y. Tien, H. M. Stern, L. J. Murray, D. P. Davis, Z. Modrusan, and S. Seshagiri.** 2006. Regulation of ERK3/MAPK6 expression by BRAF. *Int J Oncol* **29**:839-49.
16. **Huse, M., and J. Kuriyan.** 2002. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**:275-82.
17. **Jacobs, D., D. Glossip, H. Xing, A. J. Muslin, and K. Kornfeld.** 1999. Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* **13**:163-75.
18. **Julien, C., P. Coulombe, and S. Meloche.** 2003. Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J Biol Chem* **278**:42615-24.
19. **Kant, S., S. Schumacher, M. K. Singh, A. Kispert, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2006. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem* **281**:35511-9.
20. **Kleines, M., A. Gartner, K. Ritter, and L. Schaade.** 2000. Early steps in termination of the immortalization state in Burkitt lymphoma: induction of genes involved in signal transduction, transcription, and trafficking by the ganglioside IV(3)NeuAc-nLcOse(4)Cer. *Biochim Biophys Acta* **1492**:139-44.
21. **Krek, W., and E. A. Nigg.** 1991. Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *Embo J* **10**:305-16.
22. **Kyriakis, J. M., and J. Avruch.** 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**:807-69.
23. **Lee, T., A. N. Hoofnagle, Y. Kabuyama, J. Stroud, X. Min, E. J. Goldsmith, L. Chen, K. A. Resing, and N. G. Ahn.** 2004. Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol Cell* **14**:43-55.
24. **Meloche, S., B. G. Beatty, and J. Pellerin.** 1996. Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene* **13**:1575-9.
25. **Nolen, B., S. Taylor, and G. Ghosh.** 2004. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* **15**:661-75.
26. **Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**:153-83.
27. **Perander, M., E. Aberg, B. Johansen, B. Dreyer, I. J. Guldvik, H. Outzen, S. M. Keyse, and O. M. Seternes.** 2008. The Ser(186) phospho-acceptor site within ERK4 is essential for its ability to interact with and activate PRAK/MK5. *Biochem J* **411**:613-22.
28. **Raman, M., W. Chen, and M. H. Cobb.** 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**:3100-12.
29. **Robbins, D. J., E. Zhen, H. Owaki, C. A. Vanderbilt, D. Ebert, T. D. Geppert, and M. H. Cobb.** 1993. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem* **268**:5097-106.
30. **Rodier, G., A. Montagnoli, L. Di Marcotullio, P. Coulombe, G. F. Draetta, M. Pagano, and S. Meloche.** 2001. p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *Embo J* **20**:6672-82.

31. **Schumacher, S., K. Laass, S. Kant, Y. Shi, A. Visel, A. D. Gruber, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2004. Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *Embo J* **23**:4770-9.
32. **Servant, M. J., P. Coulombe, B. Turgeon, and S. Meloche.** 2000. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* **148**:543-56.
33. **Seternes, O. M., T. Mikalsen, B. Johansen, E. Michaelsen, C. G. Armstrong, N. A. Morrice, B. Turgeon, S. Meloche, U. Moens, and S. M. Keyse.** 2004. Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *Embo J* **23**:4780-91.
34. **Tassan, J. P., S. J. Schultz, J. Bartek, and E. A. Nigg.** 1994. Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol* **127**:467-78.
35. **Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson.** 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**:143-80.
36. **Zhang, F., A. Strand, D. Robbins, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 1994. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**:704-11.
37. **Zhu, A. X., Y. Zhao, D. E. Moller, and J. S. Flier.** 1994. Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3. *Mol Cell Biol* **14**:8202-11.
38. **Zimmermann, J., N. Lamerant, R. Grossenbacher, and P. Furst.** 2001. Proteasome- and p38-dependent regulation of ERK3 expression. *J Biol Chem* **276**:10759-66.



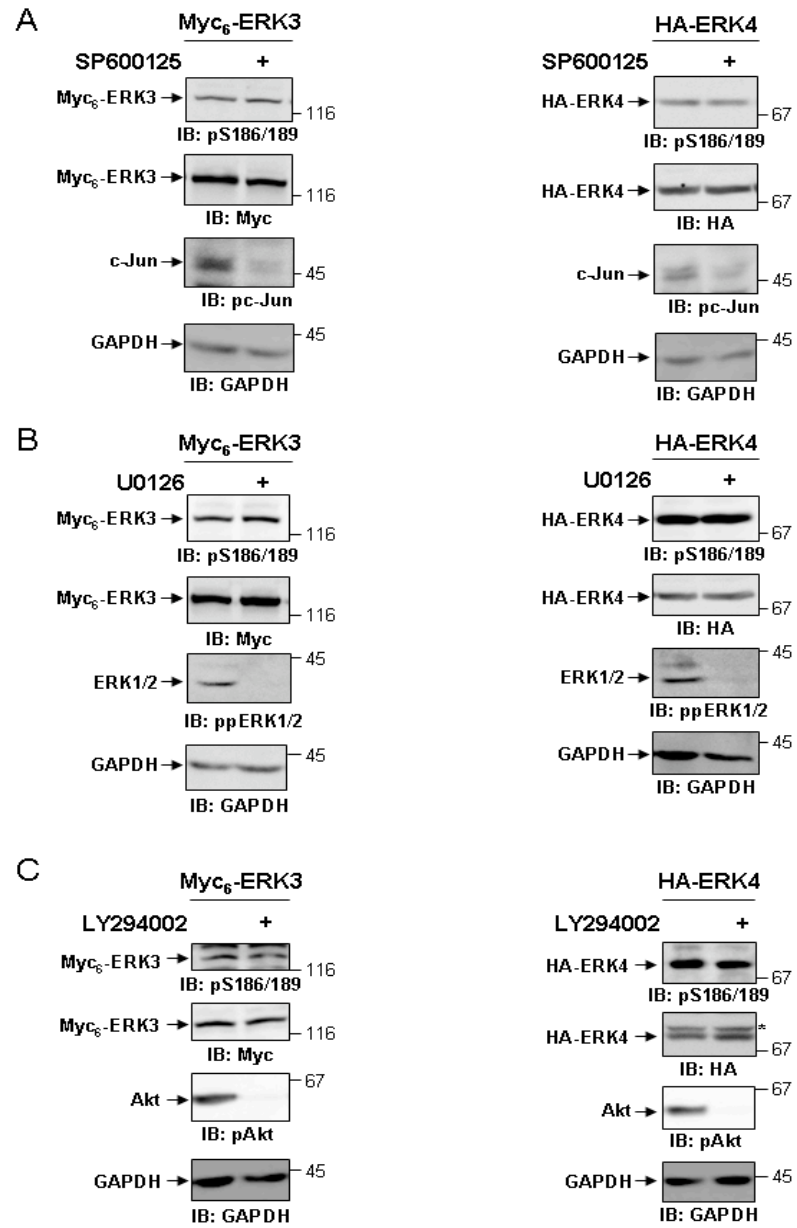
SUPPLEMENTARY FIG. 1. ERK3 and ERK4 are phosphorylated on Ser386 *in vivo*.

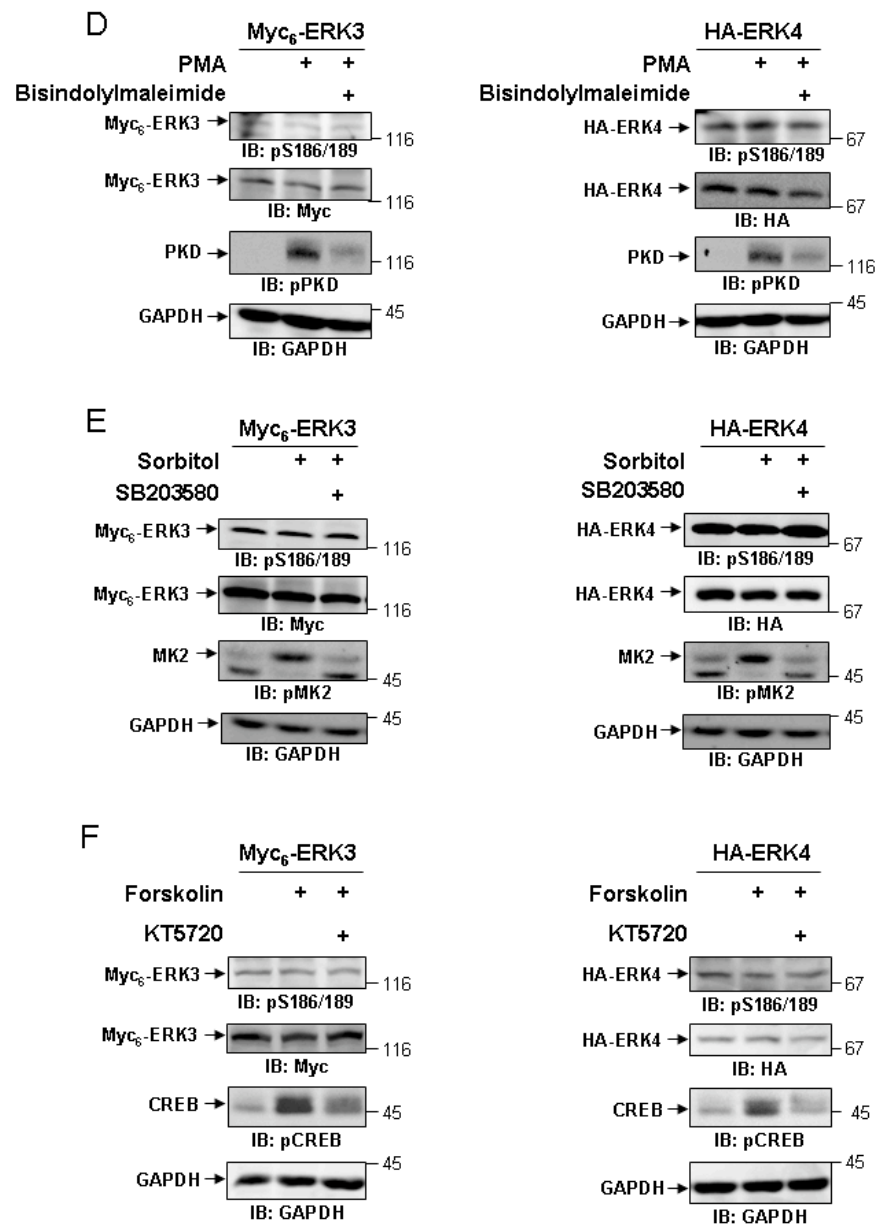
A: HEK 293 cells were transfected with Myc₆-tagged wild type (WT), S189A or S386A mutants of ERK3. The cells were metabolically labeled with ³²Pi, and the ectopic ERK3 protein was immunoprecipitated with anti-Myc antibody. Proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis, transferred to PVDF membrane and analyzed by autoradiography. The ³²P-labeled ERK3 protein band was excised from the membrane, digested with trypsin, and subjected to two-dimensional phosphopeptide mapping analysis. Major phosphopeptides are numbered. The arrowhead indicates the position of sample application. Note the disappearance of spot 2 in ERK3 S189A mutant map and spot 1 in ERK3 S386A map, respectively (arrows). **B** and **C:** Exponentially proliferating HEK 293 cells were transfected with Myc₆-ERK3 or Flag-ERK4. The cells were lysed and Myc₆-ERK3 or Flag-ERK4 was immunoprecipitated with anti-Myc or M2 anti-Flag antibody, respectively. Proteins were separated by SDS-gel electrophoresis and the corresponding silver-stained ERK3 or ERK4 band was excised from the gel and analyzed by LC-MS/MS. **B:** Tandem MS/MS spectrum of precursor ion at m/z 941.4 corresponding to peptide ALSDVTDEEVQVDPR of ERK3 bearing a phosphate group on residue S3. **C:** Tandem MS/MS spectrum of precursor ion at m/z 802.9 corresponding to ERK4 peptide AGSAPLAEDVQVDPR with a phosphate group on residue S3



SUPPLEMENTARY FIG. 2. ERK4 is phosphorylated mainly on serine residues *in vivo*.

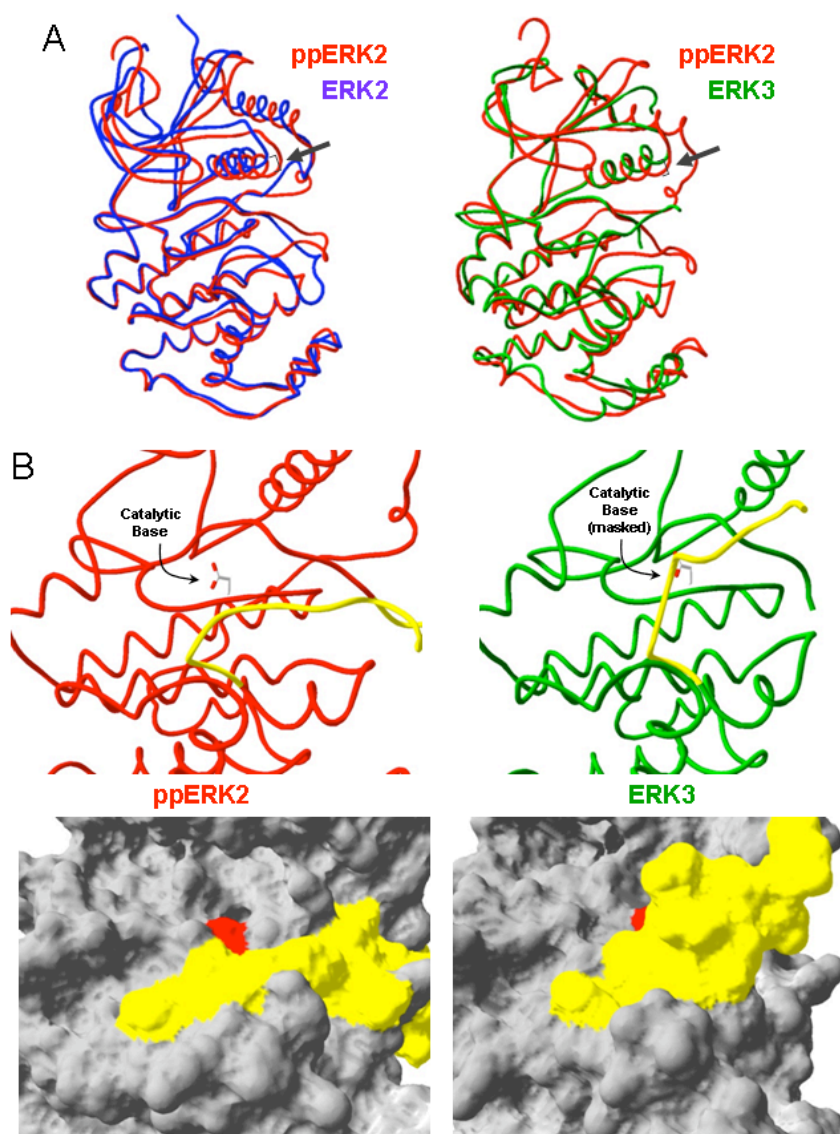
HEK 293 cells were transfected with HA-ERK4. The cells were labeled with ^{32}P i, and ectopic ERK4 protein was immunoprecipitated with anti-HA antibody. Proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis, and the ^{32}P -labeled ERK4 protein was subjected to phosphopeptide mapping (upper panel) and phosphoamino acid analysis (lower panel). Major phosphopeptides are numbered. The migration of unlabeled phosphoamino acids is indicated.





SUPPLEMENTARY FIG. 3. Effect of various protein kinase inhibitors on the activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4.

Exponentially growing HEK 293 cells were transfected with Myc₆-ERK3 or HA-ERK4 constructs. **A to C**: After 48 h, the cells were treated for 30 min with the following pharmacological inhibitors: JNK inhibitor SP600125 50 μ M (**A**), MEK1/2 inhibitor U0126 10 μ M (**B**), or phosphatidylinositol-3-OH kinase inhibitor LY294002 20 μ M (**C**). **D to F**: After 24 h, the cells were starved of serum for 24 h and incubated for 30 min with the protein kinase C inhibitor bisindolylmaleimide 10 μ M (**D**), p38 MAP kinase inhibitor SB203580 10 μ M (**E**) or protein kinase A inhibitor KT5720 10 μ M (**F**). The cells were then stimulated for 20 min with 10 μ M PMA (**D**), 400 mM sorbitol (**E**) or 20 μ M forskolin (**F**). The phosphorylation of ERK3/ERK4 on Ser189/Ser186, the total expression of ERK3/ERK4 and GAPDH, and the phosphorylation of control targets were analyzed by immunoblotting.



SUPPLEMENTARY FIG. 4. Unphosphorylated ERK3 is not in a catalytically active conformation.

A: The structures of unphosphorylated ERK2 (1ERK) and ERK3 (2I6L) were superposed on dually-phosphorylated ERK2 (2ERK) using the C-terminal lobe as reference. Note that unphosphorylated kinases are in an open configuration (see arrow). **B:** The activation loop of ERK3 partially masks its catalytic site. Doubly-phosphorylated ERK2 (left panels) and unphosphorylated ERK3 (right panels) are shown in ribbon (upper panels) and molecular surface (lower panels) representation. The catalytic base, revealing the position of the active site, is highlighted in red on the surface. The activation loop segment is colored yellow.

CHAPITRE 3

3 Caractérisation de la fonction physiologique de la MAP kinase atypique Erk4

3.1 Mise en situation

Erk4 et Erk3 sont deux membres atypiques de la famille des MAP kinases. La grande similitude entre l'organisation du gène *Mapk4* et *Mapk6* ainsi que le pourcentage élevé d'homologie entre la structure protéique de Erk4 et Erk3 suggère que ces deux kinases sont originaires d'un gène ancestral commun. Depuis leur identification il y a plus d'une dizaine d'année, ces deux kinases ont été très peu caractérisées et leurs fonctions demeurent d'ailleurs inconnues.

Dans notre laboratoire, Benjamin Turgeon a généré les souris nulles pour Erk3. L'inactivation du gène *Mapk6* a permis de révéler le rôle de Erk3 dans la survie néonatale, la croissance intra-utérine et la maturation des poumons. Afin d'identifier la fonction physiologique de Erk4, nous avons inactivé le gène *Mapk4* chez la souris. Ce chapitre traite de la caractérisation du phénotype des souris Erk4-déficientes et de la redondance fonctionnelle entre Erk4 et Erk3 *in vivo*. Je suis le premier auteur de cet article. J'ai généré les souris Erk4-déficientes et le trois-quart des résultats de l'article. Je suis également la principale rédactrice de l'article.

3.2 Article 2

Targeted Inactivation of *Mapk4* in Mice Reveals Specific Non-Redundant Functions of Erk3/Erk4 Subfamily MAP Kinases

JUSTINE ROUSSEAU,^{1,3} SONIA KLINGER,¹ BENJAMIN TURGEON,^{1,3} AND SYLVAIN MELOCHE^{1,2,3*}

Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie¹ and Departments of Pharmacology² and Molecular Biology³, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

Running title: Analysis of *Mapk4* knockout mice

Manuscript information: Total length: 32,402 characters (incl. spaces)

Materials and Methods: 766 words

Introduction, Results and Discussion sections: 2,339 words

*Corresponding author: Dr Sylvain Meloche,
Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
Université de Montréal
2950, chemin de Polytechnique
Montreal (Quebec) Canada H3T 1J4
Tel.: (514) 343-6966

Article soumis à : Molecular and Cellular Biology (MCB)

ABSTRACT

Erk4 and Erk3 are atypical members of the mitogen-activated protein (MAP) kinase family. The high sequence identity of Erk4 and Erk3 proteins and the similar organization of their genes imply that the two protein kinases are paralogs. Recently, we have shown that Erk3 function is essential for neonatal survival and critical for the establishment of fetal growth potential and pulmonary function. To investigate the specific function of Erk4, we have generated mice with a targeted disruption of the *Mapk4* gene. We show that Erk4-deficient mice are viable, fertile and exhibit no gross morphological anomalies. Loss of Erk4 is not compensated by changes in Erk3 expression during embryogenesis or in adult tissues. Importantly, we found that additional loss of Erk4 does not exacerbate the fetal growth restriction and pulmonary immaturity phenotypes of Erk3^{-/-} mice, and does not compromise the viability of Erk3^{+/-} neonates. Our analysis indicates that the MAP kinase Erk4 is dispensable for mouse embryogenesis and reveals that Erk3 has acquired specialized and essential functions that are not shared by Erk4.

INTRODUCTION

Mitogen-activated protein (MAP) kinases are core components of evolutionarily conserved signaling pathways that play a key role in eukaryotic signal transduction. These enzymes process information from a wide variety of extracellular stimuli and cellular perturbations to control multiple physiological processes required to maintain normal cellular and tissue homeostasis (3, 5, 9, 17, 26). The MAP kinase family is composed of seven distinct subfamilies in mammals: Erk1/Erk2, Jnk1/2/3, p38 α / β / δ / γ , Erk5, Erk3/Erk4, Nlk and Erk7 (3). Among these, Erk4 remains the least characterized member of the family.

Erk4 (originally known as p63^{mapk}) is a 70-kDa protein kinase that is most closely related to the MAP kinase Erk3, with 73% amino acid identity within the kinase catalytic domain (1, 7). In addition to their kinase domain located at the N-terminus, the two proteins contain a noncatalytic C-terminal region of unknown function. The first 150 residues of the C-terminal extension display nearly 50% identity between the two kinases, whereas the extreme C-terminus diverges both in length and in sequence. Erk4 and Erk3 also contain a single phospho-acceptor site (SEG) in the activation loop and the unique sequence SPR instead of APE in subdomain VIII of the kinase domain, two features that distinguish them from other MAP kinases. At the genomic level, the genes encoding Erk4 (*Mapk4*) and Erk3 (*Mapk6*) share a similar organization of exon/intron boundaries, suggesting that they arose by duplication of a common ancestor (23). All these observations imply that Erk4 and Erk3 are true paralogous proteins.

The cellular and physiological functions of Erk4 remain to be defined. Erk4 and Erk3 have a more restricted substrate specificity than conventional MAP kinases like Erk1/2, Jnk or p38, and their only substrate identified to date is the MAP kinase-activated protein kinase MK5 (6, 21, 22). Little is known either about the upstream signals that control the expression and/or activity of the two kinases. In a recent study, we have reported the phenotype of Erk3-deficient mice (12). Loss of Erk3 function leads to intrauterine growth restriction, associated with delayed lung maturation and early neonatal lethality. These findings indicate that Erk3 exerts specialized functions in certain tissues or, alternatively, that Erk3 and Erk4 display tissue-specific patterns of expression. To investigate the specific function of Erk4 and to further characterize the role of Erk3/Erk4

MAP kinase subfamily in mouse development, we generated mice with a disruption of the *Mapk4* gene. We show that Erk4-deficient mice are viable, fertile and develop normally. The absence of Erk4 is not compensated by changes in Erk3 expression and the additional loss of Erk4 in Erk3-deficient embryos does not accentuate Erk3 phenotypes. Our results suggest that Erk3 and Erk4 paralogs have evolved specific functions and reveal that Erk3 plays a more prominent role in mouse embryogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Targeting strategy and generation of *Mapk4*-deficient mice

The targeted region of the *Mapk4* gene was isolated from a mouse 129Sv genomic library in λ GEM12 bacteriophage. Identification of positive clones was done by plaque purification using a ^{32}P -labeled probe derived from exon 2 of *Mapk4* (MIG2444559). Homologous genomic fragments of 3.5 kb and 2.5 kb flanking exon 2 (encoding amino acids 1 to 182) were amplified by PCR with the following primers: forward, 5'-CCGGAATTCCTTCAAGAACTCCAGCTC-3' and reverse, 5'-CCGGAATTCTCAGCCATTGTTGCCTCAG-3' (5' fragment); forward, 5'-CGGACTAGTGGGTGTCTTCATCATCCTCTC-3' and reverse 5'-CGGACTAGTCCTACTAAGAGGAGTGGCAG-3' (3' fragment), respectively. The two genomic fragments were subcloned into pBluescript vector. Exon 2 coding sequence was replaced by the green fluorescent protein (GFP) reporter gene containing a polyadenylation signal and inserted in frame at the initiation codon of Erk4. The neomycin (Neo) resistance cassette was inserted 3' of the GFP gene. The targeting vector was linearized by Not I digestion and electroporated in R1 embryonic stem (ES) cells (14). ES cells clones that underwent homologous recombination at the *Mapk4* locus were identified by Southern blot analysis (see below). Two correctly targeted ES clones (117 and 148) were injected into C57BL/6 blastocyst-stage embryos. Chimeric males were bred with C57BL/6 female mice, and germ line transmission was confirmed by Southern blot analysis. F1 heterozygotes were intercrossed to generate homozygous mutant animals.

Genotyping of ES cells and mice

For screening of ES cells, genomic DNA was digested with KpnI and the recombinant allele was identified by Southern blot analysis using a 5' external probe amplified by PCR using the following primers: forward, 5'-ATGTGACTCAGCTGCTTG-3' and reverse 5'-CTCAGAACTCCGGTGAGT-3'. The presence of the mutated allele was confirmed by the appearance of a 6.8-kb fragment.

Mice were genotyped by PCR. The presence of the wild type allele was confirmed by amplification of a 689-bp fragment containing exon 2 coding region using the following primers: forward, 5'-TTGACTTCCAACCCCTTGGC-3' and reverse 5'-

ATTGGCCAAAGGCATGTGGC-3'. The mutated allele was identified by amplification of a 422-bp fragment specific to the GFP gene using the following primers: forward, 5'-TCTTCTTCAAGGACGACGGC-3' and reverse 5'-CTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'.

Animal husbandry

Animals were housed under pathogen-free conditions according to the procedures and protocols approved by the Université de Montréal Institutional Animal Care Committee. For breeding, heterozygous males and females in mixed C57BL/6x129/Sv background were intercrossed. The beginning of gestation (E0.5) was confirmed by the presence of a vaginal plug. Animals were sacrificed by CO₂ euthanasia. Embryos were removed by caesarean section.

Histology analysis

Tissues from E18.5 embryos and 8-week-old adult mice were fixed overnight in 10% formalin, embedded in paraffin and sectioned at 5- μ m thickness. Tissue sections were stained using conventional hematoxylin/eosin protocol. Lung sections were also stained with periodic acid-Schiff (PAS). For quantitative morphometric analysis, PAS-positive cells, tissue area and saccular airspace were measured with the Image ProPlus software on 10 randomly selected micrographs.

Antibodies and immunoblotting analysis

Antibodies were from the following sources: polyclonal anti-Erk3 (4067, Cell Signaling Technology); polyclonal anti-GFP (G8965-05-1, US Biological); and polyclonal anti-GAPDH (sc-25778, Santa Cruz Biotechnology). Polyclonal antibody to the C-terminus of Erk4 has been described (6).

For immunoblotting analysis, proteins were extracted by homogenization of 8-week-old mouse tissues as previously described (24). Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were prepared from E14.5 embryos as described (22). Lysate proteins (200 μ g) were resolved by SDS-gel electrophoresis and transferred onto Hybond-C nitrocellulose membranes. The membranes were immunoblotted with anti-Erk3 (1:750), anti-Erk4 (1:1000), anti-GFP (1:500) and anti-GAPDH (1:1000) primary antibodies. Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence.

RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA from embryos at different developmental stages was extracted by homogenizing the whole embryo in RLT buffer, and subsequently purified using the RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's specification. Integrity of the RNA was confirmed by analysis with the Agilent 2100 Bioanalyzer using the Eukaryote Total RNA Nano assay. RNA was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) with random primers. Real-time PCR amplification was detected using the ABI PRISM® 7900HT Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems). *Mapk4* transcription was monitored using the following primers: forward, 5'-GGACGTCAACAGTGAAGCCATTGA-3' and reverse, 5'-TCGATCTCGTCCTCAATGCGGAAA-3', with internal probe 5'-TCAGCATCCTTACATGAGCCCGTACT-3'. *Mapk6* expression was monitored using the primers: forward, 5'-AACGACATGACTGAGCCACACAGA-3' and reverse, 5'-TGTAAGGATGGGAAAGGGCTTCCT-3', with internal probe 5'-ATCAGCCGAGAAGCACTGGATTTCCT-3'. All reactions were runned in triplicate and the average values were used for quantification. Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) was used as endogenous control. Real-time PCR efficiencies were calculated for each gene with the Roche LC480 system: the values were 1.8791 for *Mapk4*, 1.8825 for *Mapk6* and 2.1435 for HPRT. The PCR efficiency for each gene was taken into consideration for calculation of the relative expression ratio as described by Pfaaf and Roche Diagnostics mathematical models (18).

RESULTS

Generation of Erk4-deficient mice

To inactivate the *Mapk4* gene encoding Erk4, we deleted the genomic sequence coding for amino acids 1 to 182 in exon 2 by inserting the GFP gene in frame with the initiation codon. Replacement of exon 2 by the GFP reporter gene containing a stop codon and a polyadenylation signal is predicted to generate a null allele (Fig. 1A). To identify the mutated allele, we inserted a KpnI restriction site in the targeting vector to generate a new fragment of 6.8 kb upon digestion. Two correctly targeted ES clones (Fig. 1B) were independently injected into blastocysts to generate chimeric mice. Both clones transmitted the mutant allele to the germline and were used to generate heterozygous and homozygous *Mapk4* mutant mice (Fig. 1C). Western blot analysis confirmed that no Erk4 protein expression was detectable in extracts of Erk4^{-/-} MEFs prepared from litters of heterozygous intercrosses (Fig. 1D).

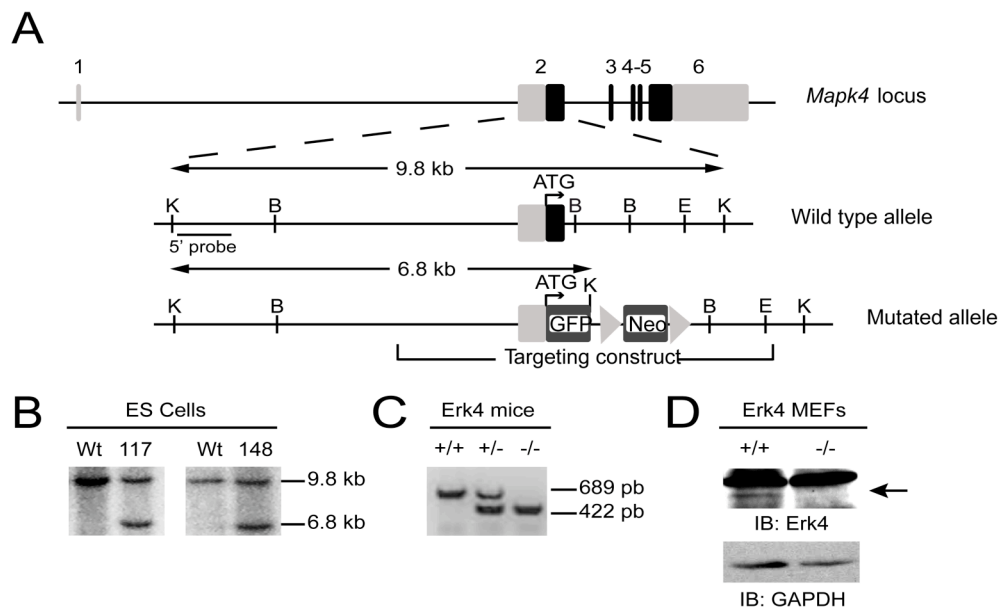


FIG. 1. Generation of Erk4-deficient mice. (A) Schematic representation of the *Mapk4* locus, targeting vector and mutated allele. Exons 1 to 6 are represented. Light boxes correspond to UTR regions and dark boxes to coding regions. The targeting vector carries a neomycin resistance gene (*Neo*) and the GFP reporter gene fused in frame with the *Mapk4* coding sequence initiation codon. A KpnI restriction site was inserted in the GFP gene to facilitate identification of the mutated allele. Restriction sites shown are: K, KpnI; B, BamHI; E, EcoRI. (B) Southern blot analysis of KpnI-digested genomic DNA from two correctly targeted ES clones indicating the wild type (9.8 kb) and mutant allele (6.8 kb). (C) PCR analysis of genomic DNA from 3-week-old Erk4^{+/+} intercross progeny. (D) Immunoblot analysis of Erk4 protein expression in total cell extracts of Erk4^{+/+} and Erk4^{-/-} MEFs.

Erk4-deficient mice are viable, fertile and exhibit no gross physiological abnormalities

Genotype analysis of the offspring from crosses of Erk4^{+/-} mice confirmed the presence of viable Erk4-deficient mice at weaning (Fig. 1C). To determine whether loss of Erk4 has any incidence on mouse viability, we analyzed the genotype distribution of Erk4^{+/-} intercross progeny generated from the two different ES clones. Inheritance of the mutated allele at the expected Mendelian frequency (Table 1) confirmed the absence of embryonic or neonatal lethality in Erk4 mutant progeny. Erk4-deficient male and female mice were similarly distributed in the progeny (Table 1) and found to be fertile, as indicated by their ability to generate litters of normal size (data not shown).

Table 1. Genotype and sex distribution analysis of the progeny^a from Erk4^{+/-} intercrosses

	Number of pups	+/+	+/-	-/-	♂	♀
Erk4(117) ^b	117	27 (23%)	64 (55%)	26 (22%)	60 (51%)	57 (49%)
Erk4(148) ^b	108	31 (29%)	46 (43%)	31 (29%)	61 (56%)	47 (44%)

^a C57BL/6-129/Sv mixed genetic background

^b Independent ES clones

Gross examination of Erk4^{-/-} mice revealed no obvious growth defect or morphological anomalies compared to wild type littermates. Likewise, a complete histopathological analysis did not reveal any structural abnormality in mutant mice (Table 2). These results show that Erk4 is dispensable for embryonic and postnatal development.

Table 2. Histopathological analysis of Erk4 knockout mice

Brain	Normal	Pancreas	Normal	Gallbladder	Normal
Kidney	Normal	Colon	Normal	Urinary bladder	Normal
Heart	Normal	Bone marrow	Normal	Small bowel	Normal
Lung	Normal	Testis	Normal	Large bowel	Normal
Spleen	Normal	Thymus	Normal	Skin	Normal
Liver	Normal	Spinal cord	Normal	Fat tissue	Normal
Striated muscle	Normal				

Loss of Erk4 is not compensated by changes in Erk3 expression

Erk4 is a paralog of Erk3, and both kinases are co-expressed in brain, lung, kidney and other tissues during mouse embryogenesis (11). Given the absence of phenotype in Erk4 null mice, we evaluated the possibility that loss of Erk4 could be compensated by changes in Erk3 expression. We first measured expression of Erk3 and Erk4 transcripts during embryonic development by quantitative RT-PCR. Erk3 mRNA level in whole embryos was the highest at E11.5 (Fig. 2A), as previously shown by Northern blot analysis (24). Interestingly, the Erk4 gene displayed a similar temporal expression pattern with a marked upregulation at E11.5 (Fig. 2A). We next measured the expression levels of Erk3 mRNA in Erk4-deficient embryos. When compared to wild type animals, no increase in Erk3 mRNA levels was detected in Erk4^{-/-} embryos at any embryonic day (Fig. 2B).

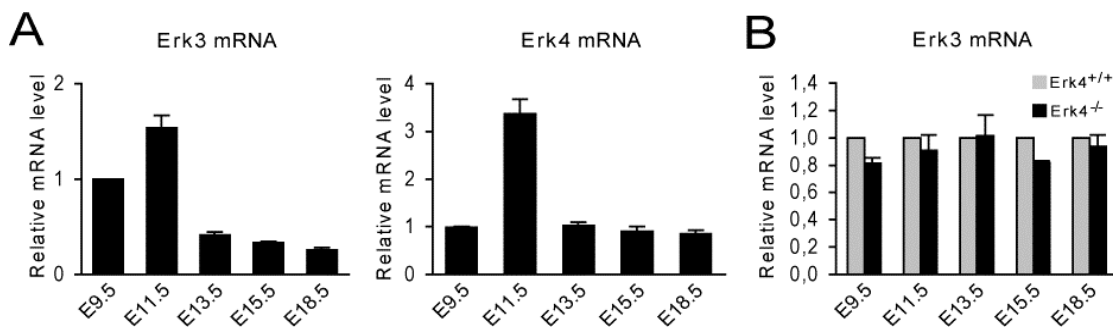


FIG. 2. Erk3 mRNA expression does not compensate for loss of Erk4 during mouse embryogenesis. Total RNA was extracted from Erk4^{+/+} and Erk4^{-/-} whole embryo littermates at different embryonic stages. Expression of Erk4 and Erk3 mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR. (A) Expression of Erk3 and Erk4 mRNA during embryonic development. Results are expressed relative to mRNA expression at E9.5. (B) Expression of Erk3 mRNA in Erk4^{-/-} embryos (black bars) relative to its expression in Erk4^{+/+} embryos (gray bars) at the corresponding embryonic days (E9.5 to E18.5).

We further analyzed the expression of Erk3 and Erk4 proteins in various adult mouse tissues by immunoblot analysis. We found that Erk4 protein is expressed at the highest level in the brain and at lower levels in all other tissues studied as shown by immunoreactivity to anti-Erk4 antibody in Erk4^{+/+} mice or to anti-GFP antibody in Erk4^{-/-} mice (Fig. 3, lower panels). Erk3 protein was detected in most tissues of wild type mice (Fig. 3, upper panel) in accordance with our previous data showing a broad expression pattern of Erk3 at the mRNA level (24). When we measured Erk3 protein levels in tissues of Erk4^{-/-} mice, we observed no change in Erk3 expression as compared to Erk4^{+/+} tissues

(Fig. 3). Together, these results suggest that loss of Erk4 is not compensated by changes in Erk3 expression during embryonic development or adult life in mice.

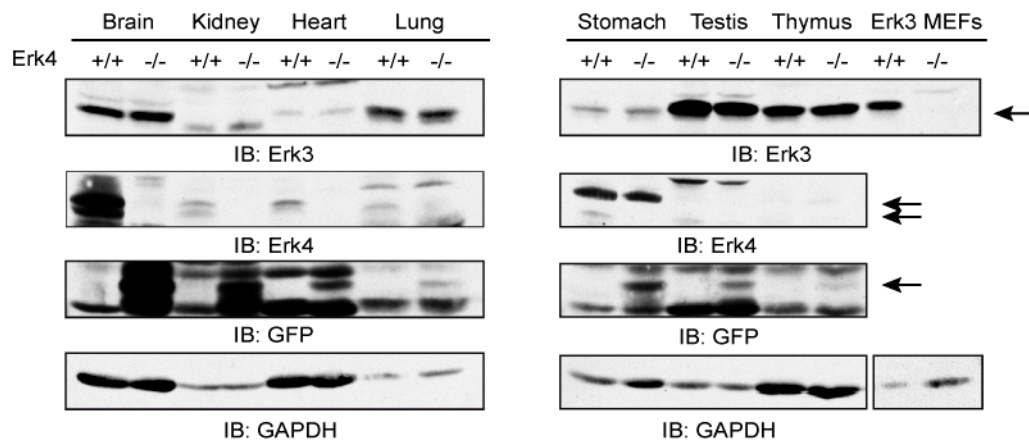


FIG. 3. **Erk3 protein expression does not compensate for loss of Erk4 in adult mouse tissues.** Total proteins were extracted by homogenization of whole tissues from 8-week-old Erk4^{+/+} and Erk4^{-/-} littermates, and equal amounts of proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis. Expression of Erk3, Erk4 and GFP protein was analyzed by immunoblotting with specific antibodies. Cellular extracts of Erk3^{+/+} and Erk3^{-/-} MEFs were used as control to show the specificity of Erk3 antibody.

Loss of Erk4 function does not accentuate Erk3-deficient mouse phenotypes

To address the question of functional redundancy between Erk4 and Erk3 during embryogenesis, we sought to determine whether loss of Erk4 accentuates the phenotypes of Erk3-deficient mice. As reported, inactivation of Erk3 in mice leads to neonatal lethality. Erk3-deficient mice display significant growth restriction at birth with a reduction (25-40%) of fetal lung, heart and liver weight (12). In addition, Erk3 null mice exhibit a lung maturation defect characterized by decreased saccular space and increased glycogen content of type II pneumocytes (12). To evaluate the contribution of Erk4 to these phenotypes, we first measured the body weight as well as the weight of the heart and the lung in the progeny of Erk4^{+/-} intercrosses at E18.5. No reduction in body weight or decrease in fetal heart and lung weights was observed in Erk4^{-/-} embryos when compared to their wild type littermates (Figs. 4A and 4B). To investigate a possible lung maturation defect, we quantitatively measured the lung saccular space and glycogen content of type II pneumocytes in Erk4^{+/-} intercross progeny at E18.5. Histological analysis of hematoxylin/eosin-stained lung sections revealed normal saccular space in Erk4^{-/-} animals (Figs. 4C and 4D). By staining lung sections with PAS, we found no difference in

intracellular glycogen content of type II pneumocytes between wild type and Erk4 mutants (Figs. 4C and 4E). These results indicate that loss of Erk4 does not alter intrauterine growth and lung maturation, and suggest that Erk3 exerts specific functions in these tissues during embryogenesis.

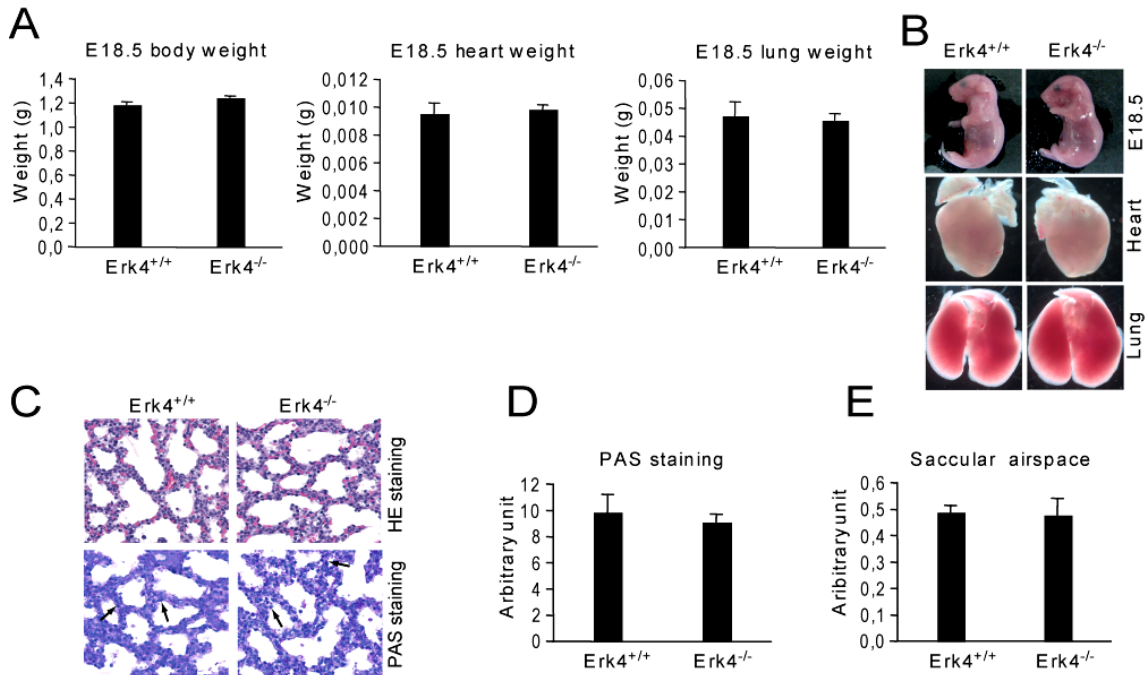


FIG. 4. Loss of Erk4 does not affect intrauterine growth or lung maturation. (A) Body, heart and lung weights of E18.5 Erk4^{+/+} and Erk4^{-/-} littermate embryos. The mean weight \pm SEM is indicated for each genotype. Body weight: Erk4^{+/+}, 1.19 \pm 0.02 g (n=25); Erk4^{-/-}, 1.25 \pm 0.01 g (n=22). Heart weight: Erk4^{+/+}, 0.0096 \pm 0.0008 g (n=5); Erk4^{-/-}, 0.0098 \pm 0.0002 g (n=11). Lung weight: Erk4^{+/+}, 0.047 \pm 0.005 g (n=5); Erk4^{-/-}, 0.046 \pm 0.002 g (n=11). (B) Representative photographs of embryos, heart and lung from wild type and Erk4^{-/-} embryos at E18.5. (C) Representative photographs of lung sections from E18.5 Erk4^{+/+} and Erk4^{-/-} embryos stained with hematoxylin and eosin (HE) or periodic acid-Schiff (PAS). Arrows indicate cytoplasmic glycogen. Magnification, x40. Quantification of PAS staining (D) and lung saccular airspace (E) in Erk4^{+/+} and Erk4^{-/-} embryos at E18.5 (n=3).

To further test the genetic interaction between Erk3 and Erk4 during embryonic development, we next sought to determine whether additional loss of Erk4 in Erk3^{-/-} mice accentuates Erk3 phenotypes. To address this question, we first repeated the growth and lung maturation analyses in Erk3^{+/+} and Erk4^{-/-};Erk3^{+/+} intercross progeny at E18.5. Since loss of Erk4 has no effect on fetal growth or lung maturation, we intercrossed Erk4^{-/-};Erk3^{+/+} mice instead of Erk4^{+/+};Erk3^{+/+} animals in order to increase the frequency of Erk4^{-/-};Erk3^{+/+} embryos in each litter. When we compared Erk3^{-/-} and Erk4^{-/-};Erk3^{-/-} embryos, we found that additional loss of Erk4 did not further decrease the body weight of Erk3-deficient mice:

Erk3^{-/-}, 0.96 ± 0.03 g versus Erk4^{-/-}Erk3^{-/-}, 0.95 ± 0.02 g (Fig. 5). The reduction of body weight in Erk4^{-/-}Erk3^{-/-} (17%) was similar to that observed in Erk3^{-/-} embryos (16%) when compared to their respective controls (Fig. 5).

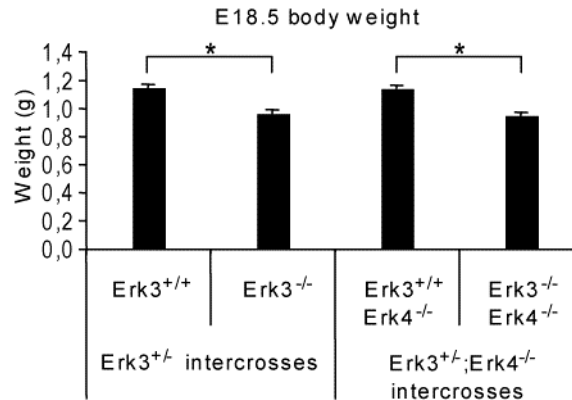


FIG. 5. Additional loss of Erk4 does not accentuate Erk3 intrauterine growth restriction phenotype. Body weight of E18.5 Erk3^{+/+}, Erk3^{-/-}, Erk4^{-/-}Erk3^{+/+} and Erk4^{-/-}Erk3^{-/-} embryos. The mean body weight \pm SEM is indicated for each genotype: Erk3^{+/+}, 1.15 ± 0.02 g (n=22); Erk3^{-/-}, 0.96 ± 0.03 g (n=15); Erk4^{-/-}Erk3^{+/+}, 1.14 ± 0.02 g (n=10); Erk4^{-/-}Erk3^{-/-}, 0.95 ± 0.02 g (n=24). *p < 0.001.

We next evaluated the pulmonary immaturity phenotype in E18.5 embryos. We observed a similar decrease in saccular space between double Erk4/Erk3-deficient mice (40%) and Erk3-deficient mice (32%) (Figs. 6A and 6B). In addition, the increase in the number of type II pneumocytes containing cytoplasmic glycogen granules was not accentuated in Erk4^{-/-}Erk3^{-/-} embryos (2.2-fold) as compared to Erk3^{-/-} embryos (2.6-fold) (Figs. 6A and 6C). Together, these results strongly suggest that intrauterine growth restriction and lung maturation defect are solely due to Erk3 inactivation.

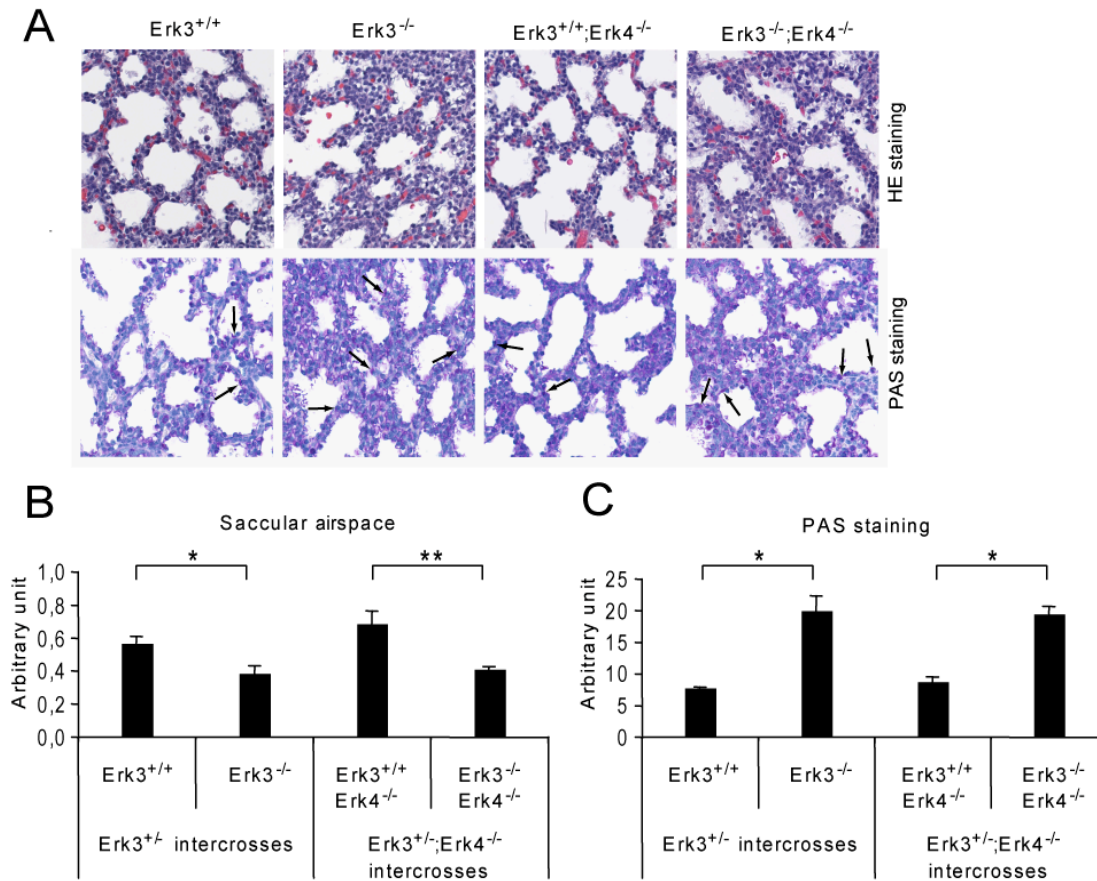


FIG. 6. Additional loss of Erk4 does not aggravate the pulmonary immaturity phenotype of Erk3 mutant mice. (A) Representative photographs of lung sections from E18.5 Erk3^{+/+}, Erk3^{-/-}, Erk4^{-/-};Erk3^{+/+} and Erk4^{-/-};Erk3^{-/-} embryos stained with HE or PAS. Arrows indicate cytoplasmic glycogen. Magnification, x40. Quantification of lung saccular airspace (B) and PAS staining (C) in Erk3^{+/+}, Erk3^{-/-}, Erk4^{-/-};Erk3^{+/+} and Erk4^{-/-};Erk3^{-/-} embryos at E18.5 (n=5-7). *p < 0.05, **p < 0.001.

Finally, to determine whether additional loss of Erk4 in Erk3^{+/-} mice may have some incidence on Erk3^{+/-} mouse viability and could mimic Erk3^{-/-} lethal phenotype, we analyzed the genotype distribution of Erk4^{+/-};Erk3^{+/-} intercross progeny. Additional loss of one or two alleles of Erk4 did not increase the prevalence of Erk3^{+/-} mouse lethality as confirmed by the presence of Erk4^{-/-};Erk3^{+/-} mice (15%) at the expected Mendelian frequency considering the lethality of Erk3^{-/-} mice (16.7%) (Table 3). Thus, Erk4 is dispensable for mouse embryogenesis and loss of Erk4 has no impact on the known physiological functions of Erk3.

Table 3. Genotype analysis of the progeny^a from Erk4^{+/-};Erk3^{+/-} intercrosses

	Erk3	Erk4 ^{+/+}			Erk4 ^{+/-}			Erk4 ^{-/-}		
		+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-
		7%	18%	0%	13%	36%	0%	11%	15%	0%
Expected ^b		8,33%	16,66%	0%	16,66%	33,33%	0%	8,33%	16,66%	0%
		(6,25)	(12,5)	(6,25)	(12,5)	(25)	(12,5)	(6,25)	(12,5)	(6,25)

^a C57BL/6-129/Sv mixed genetic background, n=100^b Frequencies expected considering Erk3 null mice lethality. Frequencies in brackets correspond to Mendelian inheritance.

DISCUSSION

Erk4 and Erk3 are atypical members of the MAP kinase family. Despite their identification more than fifteen years ago, the signaling events that control their activity and their physiological functions remain poorly understood. The similar organization of the *Mapk4* and *Mapk6* genes and the high sequence identity of their protein products led us to infer that Erk4 and Erk3 are paralogous proteins (3, 23). Paralogs refer to genes in the same organism that evolved by gene duplication (13). By definition, paralogous proteins experience low evolutionary pressure and their specificity eventually diverges leading to the acquisition of specialized functions. Recently, we have reported that loss of Erk3 leads to intrauterine growth restriction, delayed lung maturation and neonatal death within the first day of life (12). To investigate the specific physiological function of Erk4, we have generated mice with a targeted disruption of the *Mapk4* gene. Unlike its paralog Erk3, inactivation of Erk4 results in no obvious phenotypic alteration. Erk4-deficient mice are found at the expected Mendelian frequency, they are viable, fertile and display no gross physiological abnormality.

Although paralogy is associated with functional diversification, paralogs may also retain ancestral functions due to gene dosage effects. One consequence of this genetic redundancy is an increase in genetic robustness against null mutations (8). Functional redundancy of gene duplicates is widespread and is often cited to account for the absence of phenotype in mouse mutants. The inactivation of the *MyoD* and *Myf5* genes involved in myogenesis is a classical example of functional compensation by paralog genes. Indeed, loss of *MyoD* or *Myf5* has no impact on muscle development (2, 19) whereas inactivation of both genes results in a complete absence of skeletal muscles (20). The overlapping pattern of Erk4 and Erk3 expression in tissues of the developing mouse embryo (11) is consistent with the idea that the two kinases may exert some redundant functions. To ask whether Erk4 and Erk3 functionally overlap, we analyzed the phenotype of compound mutant mice. Our results indicate that Erk4 and Erk3 do not exhibit genetic interactions under the controlled physiological conditions tested in this study. First, Erk3 mRNA levels are not upregulated in tissues of Erk4-deficient mice. Second, Erk4 inactivation does not aggravate the fetal growth and lung maturation phenotypes of Erk3 mutant mice. Third,

loss of Erk4 does not lead to neonatal lethality of Erk3^{+/-} mice and no additional phenotype is observed in mice lacking both Erk4 and Erk3 kinases.

Phenotypic differences of paralog-deficient mice are a good indication of specialized functions *in vivo*, but inactivation of both genes is required to fully address the question. For example, inactivation of Erk1 does not result in any developmental defect (16) whereas conditional inactivation of Erk2 in the neural crest results in craniofacial and conotruncal cardiac embryonic defects (15), suggesting that Erk1 and Erk2 exert non-redundant functions in neural crest development. However, additional mutation of Erk1 revealed that Erk2 neural crest-derived phenotypes are dose-dependently accentuated by the loss of Erk1 (15). Thus, the distinct phenotypes of Erk1 and Erk2 mutant mice is rather due to Erk2 compensation than to Erk2 specific function in neural crest development. The results presented here demonstrate that Erk3 has acquired specialized functions through evolutionary diversification. However, we cannot exclude the possibility that Erk3 and Erk4 may exhibit partial genetic redundancy under different environmental conditions or under cellular stresses. Further studies will be required to test this idea.

Genetic studies in yeast have provided evidence that diversification of paralogs is often asymmetrical with one member of the gene pair acquiring more complex regulatory mechanisms and protein-protein interactions than the other (25). Despite their similarities, Erk3 and Erk4 show distinct structural and regulatory properties. First, Erk3 and Erk4 share 73% amino acid identity in the kinase domain, but this similarity decreases to 31% in the C-terminal region with Erk3 having 137 additional amino acids. Second, Erk4 is a stable protein whereas Erk3 is unstable being constitutively degraded by the ubiquitin-proteasome pathway (1, 4, 11). Third, Erk3 and Erk4 exhibit distinct subcellular localization in various cell types (1, 10). From our analysis, we conclude that Erk3 has acquired more specialized and essential functions than its paralog Erk4 and that Erk4 is dispensable for mouse embryogenesis under normal physiological conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the scientific contribution of many colleagues, with special thanks to P. Coulombe and M. Saba-El-Leil. We also thank Kim Lévesque for outstanding technical assistance, Louis Gaboury for histopathological analysis, and IRIC histology and genomic facilities. S. Meloche holds the Canada Research Chair in Cellular Signaling. This work was supported by a grant to S. Meloche from the Canadian Institutes for Health Research.

REFERENCES

1. **Aberg, E., M. Perander, B. Johansen, C. Julien, S. Meloche, S. M. Keyse, and O. M. Seternes.** 2006. Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J. Biol. Chem.* **281**:35499-510.
2. **Braun, T., M. A. Rudnicki, H. H. Arnold, and R. Jaenisch.** 1992. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* **71**:369-82.
3. **Coulombe, P., and S. Meloche.** 2007. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**:1376-87.
4. **Coulombe, P., G. Rodier, S. Pelletier, J. Pellerin, and S. Meloche.** 2003. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **23**:4542-58.
5. **Cuenda, A., and S. Rousseau.** 2007. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**:1358-75.
6. **Deleris, P., J. Rousseau, P. Coulombe, G. Rodier, P. L. Tanguay, and S. Meloche.** 2008. Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *J. Cell. Physiol.* **217**:778-88.
7. **Gonzalez, F. A., D. L. Raden, M. R. Rigby, and R. J. Davis.** 1992. Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett.* **304**:170-178.
8. **Gu, Z., L. M. Steinmetz, X. Gu, C. Scharfe, R. W. Davis, and W. H. Li.** 2003. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* **421**:63-6.
9. **Hayashi, M., and J. D. Lee.** 2004. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J. Mol. Med.* **82**:800-8.
10. **Julien, C., P. Coulombe, and S. Meloche.** 2003. Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* **278**:42615-24.
11. **Kant, S., S. Schumacher, M. K. Singh, A. Kispert, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2006. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J. Biol. Chem.* **281**:35511-9.
12. **Klinger, S., B. Turgeon, K. Lévesque, G. A. Wood, K. M. Aagaard-Tillery, and S. Meloche.** 2009. Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity and neonatal lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: in press.
13. **Koonin, E. V.** 2005. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu. Rev. Genet.* **39**:309-38.
14. **Nagy, A., J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly, and J. C. Roder.** 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8424-8.
15. **Newbern, J., J. Zhong, R. S. Wickramasinghe, X. Li, Y. Wu, I. Samuels, N. Cherosky, J. C. Karlo, B. O'Loughlin, J. Wikenheiser, M. Gargasha, Y. Q. Doughman, J. Charron, D. D. Ginty, M. Watanabe, S. C. Saitta, W. D. Snider, and G. E. Landreth.** 2008. Mouse and human phenotypes indicate a critical

- conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:17115-20.
16. **Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger, and J. Pouyssegur.** 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* **286**:1374-7.
 17. **Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**:153-83.
 18. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45.
 19. **Rudnicki, M. A., T. Braun, S. Hinuma, and R. Jaenisch.** 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**:383-90.
 20. **Rudnicki, M. A., P. N. Schnegelsberg, R. H. Stead, T. Braun, H. H. Arnold, and R. Jaenisch.** 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**:1351-9.
 21. **Schumacher, S., K. Laass, S. Kant, Y. Shi, A. Visel, A. D. Gruber, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2004. Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *EMBO J.* **23**:4770-9.
 22. **Seternes, O. M., T. Mikalsen, B. Johansen, E. Michaelsen, C. G. Armstrong, N. A. Morrice, B. Turgeon, S. Meloche, U. Moens, and S. M. Keyse.** 2004. Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *EMBO J.* **23**:4780-91.
 23. **Turgeon, B., B. F. Lang, and S. Meloche.** 2002. The Protein Kinase ERK3 Is Encoded by a Single Functional Gene: Genomic Analysis of the ERK3 Gene Family. *Genomics* **80**:673-80.
 24. **Turgeon, B., M. K. Saba-El-Leil, and S. Meloche.** 2000. Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *Biochem. J.* **346**:169-175.
 25. **Wagner, A.** 2002. Asymmetric functional divergence of duplicate genes in yeast. *Mol. Biol. Evol.* **19**:1760-8.
 26. **Weston, C. R., and R. J. Davis.** 2007. The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**:142-9.

CHAPITRE 4

4 Discussion

4.1 Caractérisation du mécanisme d'activation de Erk3/4

4.1.1 La boucle d'activation de Erk3/4 est phosphorylée en *trans in vivo*

L'activation des MAP kinases est dépendante de la phosphorylation de leur boucle d'activation. Chez les MAP kinases classiques, cette phosphorylation est assurée en *trans* par une autre kinase, elle-même régulée par phosphorylation. On ignore si ce mode de régulation contrôle également l'activité enzymatique des MAP kinases atypiques. Jusqu'à maintenant, aucune kinase activatrice de Erk7/8, Nlk et Erk3/4 n'a été identifiée.

La boucle d'activation de Erk3 et Erk4 est caractérisée par la présence d'un motif SEG au lieu du motif TXY, motif conservé parmi les MAP kinases classiques. Il y a de cela une quinzaine d'années, le groupe de M.H.Cobb a montré que la S¹⁸⁹ de la boucle d'activation de Erk3 est phosphorylée *in vivo*. De plus, une kinase capable de phosphoryler cette sérine a été partiellement purifiée sans toutefois être caractérisée davantage (7, 8). Nous avons montré pour la première fois que la boucle d'activation de Erk4 est également phosphorylée *in vivo*. De plus, nous avons confirmé que la phosphorylation de la S¹⁸⁹/S¹⁸⁶ de la boucle d'activation de Erk3/4 s'effectue en *trans* par une kinase endogène.

Nos résultats indiquent que la phosphorylation de la S¹⁸⁶ de Erk4 dépend aussi de l'activité kinase de Erk4. Ainsi, contrairement à Erk3, la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk4 semble être due en partie à une auto-phosphorylation. Erk7 est un autre exemple de MAP kinase atypique qui s'auto-phosphoryle sur sa boucle d'activation. D'ailleurs, la boucle d'activation de Erk7 est constitutivement phosphorylée *in vivo* et cette phosphorylation semble dépendre uniquement de l'activité kinase de Erk7 (1, 2). Dans certaines conditions, la MAP kinase classique p38 utilise également l'auto-phosphorylation comme mode d'activation alternatif. Par exemple, le groupe de J.D. Ashwell a montré que dans les lymphocytes T, la stimulation des récepteurs TCR (T-cell receptor) et l'activation de la kinase ZAP70 conduit à l'auto-phosphorylation de p38 sur sa boucle d'activation (T¹⁸⁰GY¹⁸²) (46). Cette auto-phosphorylation serait induite suite à la phosphorylation de p38 sur la Y³²³ par la kinase ZAP70 (46).

Considérant que l'auto-phosphorylation de Erk4 puisse être le résultat d'une phosphorylation inter-moléculaire (en *trans*), nous ne pouvons exclure que la phosphorylation résiduelle observée sur la S¹⁸⁶ du mutant catalytiquement inactif ne soit le résultat de l'activité de Erk4 endogène. D'ailleurs, le groupe de M. Gastel a montré que Erk4 peut former des homo-dimères et des hétéro-dimères avec Erk3, du moins en surexpression (27). L'expression d'un mutant catalytiquement inactif de Erk4 dans les MEFs Erk3^{-/-};Erk4^{-/-} permettrait d'évaluer la contribution de l'activité de Erk4 et Erk3 sur la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk4 et de confirmer ou d'infirmer qu'une autre kinase est responsable de cette phosphorylation.

4.1.2 La phosphorylation de la boucle d'activation de Erk3/4 n'est pas modulée par les stimuli classiques des MAP kinases

La boucle d'activation des MAP kinases classiques est rapidement phosphorylée (5-15 min) en réponse à divers stimuli extra-cellulaires. Contrairement à ces dernières, la boucle d'activation de Erk3/4 est phosphorylée en absence de stimuli et cette phosphorylation n'est pas modulée de manière significative par les stimuli classiques des MAP kinases, dont le sérum, le PMA et le sorbitol. De plus, l'inhibition de plusieurs kinases telles que MEK1/2, de la PI3K (Phosphatidyl-inositol-3-OH kinase), de la PKC (Protein kinase C) et de la PKA (Protein kinase A) n'ont eu aucun effet significatif sur l'état de phosphorylation de la boucle d'activation de Erk3/4.

Nos résultats suggèrent que la boucle d'activation de Erk3/4 est constitutivement phosphorylée *in vivo*. Il est également possible que cette phosphorylation représente un état basal et que dans certaines conditions, non identifiées à ce jour, cette phosphorylation soit modulable. Le premier cas impliquerait que la kinase de Erk3/4 soit constitutivement active. Bien que cette kinase ne soit pas encore identifiée, il existe plusieurs exemples de kinases qui ont une activité constitutive. La kinase CK2 (Casein kinase) (36) et CAK (Cdk-activating kinase) (55) sont des kinases qui présentent cette caractéristique. D'ailleurs, CAK est la kinase responsable de la phosphorylation de la boucle d'activation des différentes Cdks tout au long de la progression du cycle cellulaire (26, 55). Dans le deuxième cas de figure, la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk3/4 pourrait être le résultat de l'activité basale d'une kinase fortement exprimée. Par exemple, le groupe de

M. Frodin a montré que l'activité basale de Erk1/2 est responsable de près de 50% de la phosphorylation constitutive de RSK4 observée *in vivo* (12).

Considérant que la boucle d'activation de Erk3/4 est phosphorylée en absence de stimuli *in vivo*, il serait relativement facile d'identifier la kinase responsable de cette phosphorylation en criblant une banque de shRNA contre les 500 kinases du génome. Un anticorps phospho-spécifique contre la S¹⁸⁹/S¹⁸⁶ pourrait être utilisé afin de monitorer l'état de phosphorylation de la boucle d'activation. L'identification de cette kinase serait un atout majeur non seulement pour la caractérisation du mécanisme d'activation de Erk4 mais également pour l'identification de sa fonction.

4.1.3 MK5 augmente indirectement la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk3/4

MK5 est le seul substrat de Erk3/4 identifié jusqu'à maintenant (3, 27, 47, 49). De manière surprenante, nous avons observé que la simple co-expression de MK5 et Erk3/4 augmente la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk3/4. Cette augmentation ne dépend ni de l'activité kinase de MK5 ni de l'auto-phosphorylation de Erk3/4, ce qui suggère fortement que MK5 accentue indirectement la phosphorylation de la S¹⁸⁹/S¹⁸⁶ en facilitant le recrutement et/ou l'activation d'une kinase cellulaire. Il serait intéressant de regarder le rôle de MK5 sur la phosphorylation basale de la boucle d'activation de Erk3/4 en utilisant par exemple une approche de perte de fonction.

Le groupe de M. Gastel a montré que les niveaux de Erk3 sont sévèrement compromis dans les MEFs MK5^{-/-}, suggérant que MK5 a un effet sur la stabilité et/ou l'expression de Erk3 (47). Parallèlement, il a été rapporté que MK2, un autre membre de cette famille de kinase, stabilise les niveaux protéiques de la MAP kinase p38 *in vivo* (32). Ainsi, il est possible que l'augmentation de la phosphorylation de la boucle d'activation soit en partie attribuable à l'effet de MK5 sur la stabilité de Erk3/4. En accord avec cette hypothèse, nous avons observé que l'expression de MK5 augmente légèrement les niveaux protéiques de Erk3/4.

Nous ne pouvons exclure que l'activité kinase de Erk3/4 endogène contribue à l'augmentation de la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk3/4 ectopique. Il est

possible que l'expression de MK5 augmente les niveaux de Erk3/4 endogènes, facilite l'homo- ou l'hétéro-dimérisation entre Erk3/4 endogène et ectopique et ainsi, l'auto-phosphorylation en *trans*. La phosphorylation de la boucle d'activation de mutants catalytiquement inactifs de Erk3/4 co-exprimés avec MK5 dans les MEFs Erk3^{-/-};Erk4^{-/-} permettraient de tester cette possibilité.

4.2 La phosphorylation de la S¹⁸⁹/S¹⁸⁶ de la boucle d'activation de Erk3/4 est requise pour la liaison, l'activation et la relocalisation subcellulaire de MK5

Pour la majorité des kinases, la phosphorylation de la boucle d'activation est importante pour l'activité enzymatique. Nous avons montré que la phosphorylation de la S¹⁸⁹/S¹⁸⁶ régule de manière positive l'activité kinase de Erk3/4. En effet, la mutation de ce résidu abolit complètement l'activation de MK5 *in vivo*. L'impact de cette phosphorylation sur l'activité enzymatique de Erk3/4 est également attribuable au fait que cette sérine joue un rôle primordial pour l'interaction stable kinase-substrat. Récemment, le groupe de O.M. Seternes a identifié un motif (FRIEDE) situé sur la boucle L16 de Erk3/4 qui est essentiel pour l'interaction entre Erk3/4 et MK5 et pour l'activation de MK5 (4). La cristallographie de Erk2 sous sa forme active et inactive révèle que la phosphorylation de la boucle d'activation induit un changement de conformation majeur au niveau de la boucle d'activation et de la boucle L16 (6). De plus, le groupe de M.H. Cobb a mis en évidence que la région exposée suite au changement de conformation de la boucle L16 est importante pour la dimérisation de Erk2 (28). De manière semblable, il est possible que la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk3/4 induise un changement de conformation qui expose le motif FRIEDE situé sur la boucle L16 et permet ainsi l'interaction stable avec MK5.

En surexpression, MK5 est localisée majoritairement au noyau (48), tout comme Erk3 (25), alors que Erk4 est principalement localisée dans le cytoplasme (3). L'interaction entre Erk3/4 et MK5 entraîne l'accumulation du complexe au cytoplasme (3, 27, 47, 49). La relocalisation de MK5 est indépendante de l'activité enzymatique de l'une ou l'autre de ces kinases. En accord avec l'importance de la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk3/4 pour la formation du complexe Erk3/4-MK5, nous avons montré que la mutation de la S¹⁸⁹/S¹⁸⁶ perturbe ce changement de localisation.

4.3 Erk4 et MK5 sont des kinases mutuelles

Le groupe de M. Gastel a montré que Erk4 est également un substrat de MK5 *in vivo* (27, 49), révélant ainsi une relation complexe entre ces deux kinases. En accord avec la fonction activatrice de Erk4, la phosphorylation de Erk4 par MK5 nécessite d'abord l'activation de MK5 par Erk4 (27). L'identité des résidus de Erk4 phosphorylés par MK5 ne sont pas connus et nous ne connaissons pas non plus l'impact de cette phosphorylation. Lors de mes études doctorales, nous avons entamé l'identification de ces résidus. Dans un premier temps, nous avons effectué un marquage métabolique au ^{32}P afin de déterminer l'identité des résidus phosphorylés par MK5 *in vivo*. L'analyse des cartes phosphopeptidiques a révélé la présence de quatre nouveaux phospho-peptides, tous composés de résidus phospho-sérines, lorsque MK5 et Erk4 sont co-exprimées (FIG. 12.).

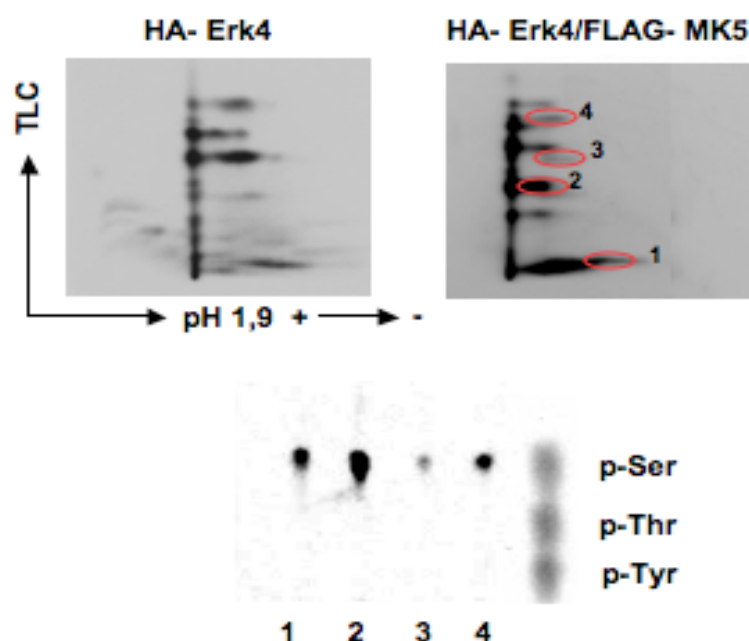


FIG. 12. Erk4 est phosphorylée par MK5 *in vivo* sur des résidus sérines.

Brièvement, suite au marquage métabolique avec du ^{32}P , les phospho-peptides ont été générés par digestion tryptique de HA-Erk4 immunoprécipité à partir des lysats de cellule HEK 293 transfectées avec HA-Erk4 seule ou avec MK5. Les phospho-peptides ont été séparés dans une première dimension par électrophorèse à pH 1.9, puis dans une deuxième dimension par chromatographie (TLC, Thin layer chromatographie). Quatre nouveaux phospho-peptides (numéroté de 1 à 4) ont été générés en présence de MK5. Ces différents phospho-peptides ont été isolés puis soumis à une hydrolyse acide partielle avant que les résidus soient séparés dans une seule dimension par électrophorèse à pH 2,5. La phosphorylation a été détectée par auto-radiographie.

La phosphorylation de Erk4 par MK5 est facilement détectable sur gel de polyacrylamide dénaturant puisque la forme hyper-phosphorylée de Erk4 montre un retard de motilité important. Nous avons profité de cette caractéristique pour comparer le profil de migration de différents mutants tronqués de Erk4 lorsque ceux-ci sont exprimés seuls ou avec MK5, afin de déterminer la localisation des résidus phosphorylés. Au préalable, nous nous sommes assurés que les différents mutants de délétion étaient phosphorylés sur la boucle d'activation et interagissaient toujours avec MK5.

La comparaison des différents profils de migration montre que la délétion des 222 derniers acides aminés n'affecte pratiquement plus le profil de migration de Erk4 lorsqu'elle est exprimée avec MK5, indiquant ainsi que les résidus phosphorylés par MK5 sont principalement situés sur l'extrémité C-terminale de Erk4 en aval du résidu 365 (FIG. 13.).

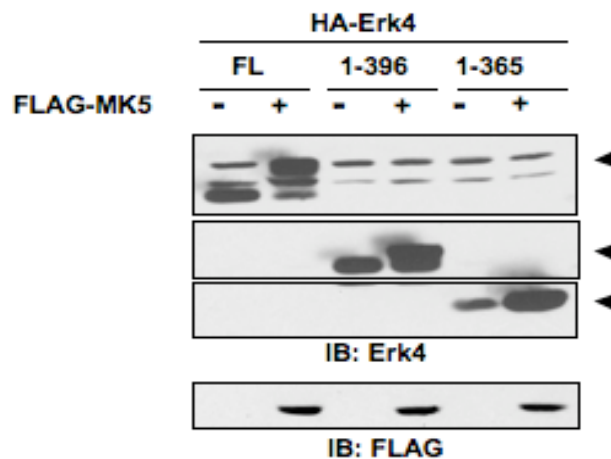


FIG. 13. MK5 phosphoryle l'extrémité C-terminale de Erk4. MK5 phosphoryle l'extrémité C-terminale de Erk4.

Les cellules HEK 293 ont été transfectées avec HA-Erk4 pleine longueur (FL) et deux mutants tronqués de Erk4 (1-396 et 1-365) seuls ou avec FLAG-MK5. La phosphorylation de Erk4 par MK5 est détectable par la présence d'une bande additionnelle de plus haut poids moléculaire (flèche). Les protéines ont été visualisées par Western-Blot.

En parallèle, nous avons utilisé une approche de spectrométrie de masse afin d'identifier la position des résidus phosphorylés par MK5. Pour ce faire, nous avons co-exprimé Erk4 avec MK5 ou un mutant catalytiquement inactif de MK5, puis comparé les sites de phosphorylation retrouvés sur Erk4. Ayant observé que les sites de phosphorylation

sont situés principalement sur l'extrémité C-terminale, nous avons concentré notre recherche sur les résidus phosphorylés dans cette région.

Nous avons identifié quatre sites de phosphorylation sur Erk4, soit la sérine 386, la sérine 434, la sérine 508 et la sérine 521 (FIG. 14.). Cependant, la phosphorylation de ces résidus a également été détectée dans l'échantillon contenant Erk4 exprimée avec le mutant catalytiquement inactif de MK5. Ainsi, nous ne pouvons tirer aucune conclusion quant aux résidus spécifiquement phosphorylés par MK5. D'ailleurs, trois de ces résidus sérines (434, 508, 521) sont suivis d'un résidu proline et se retrouvent ainsi dans un site consensus de phosphorylation pour les MAP kinases ainsi que pour les Cdks. De plus, basé sur la séquence consensus de phosphorylation pour MK5 (Hyd-X-R-X-L-pS/T), aucun résidu sérine ne se retrouve à l'intérieur de cette séquence. La séquence contenant la sérine 386 possède cependant un résidu arginine, résidu critique à la position -3. Cette sérine pourrait potentiellement être phosphorylée par MK5. D'ailleurs, ce résidu est conservé sur Erk3 et est également phosphorylé *in vivo*. Quoi qu'il en soit, notre analyse a permis d'identifier quatre nouveaux sites de phosphorylation sur Erk4 *in vivo*.

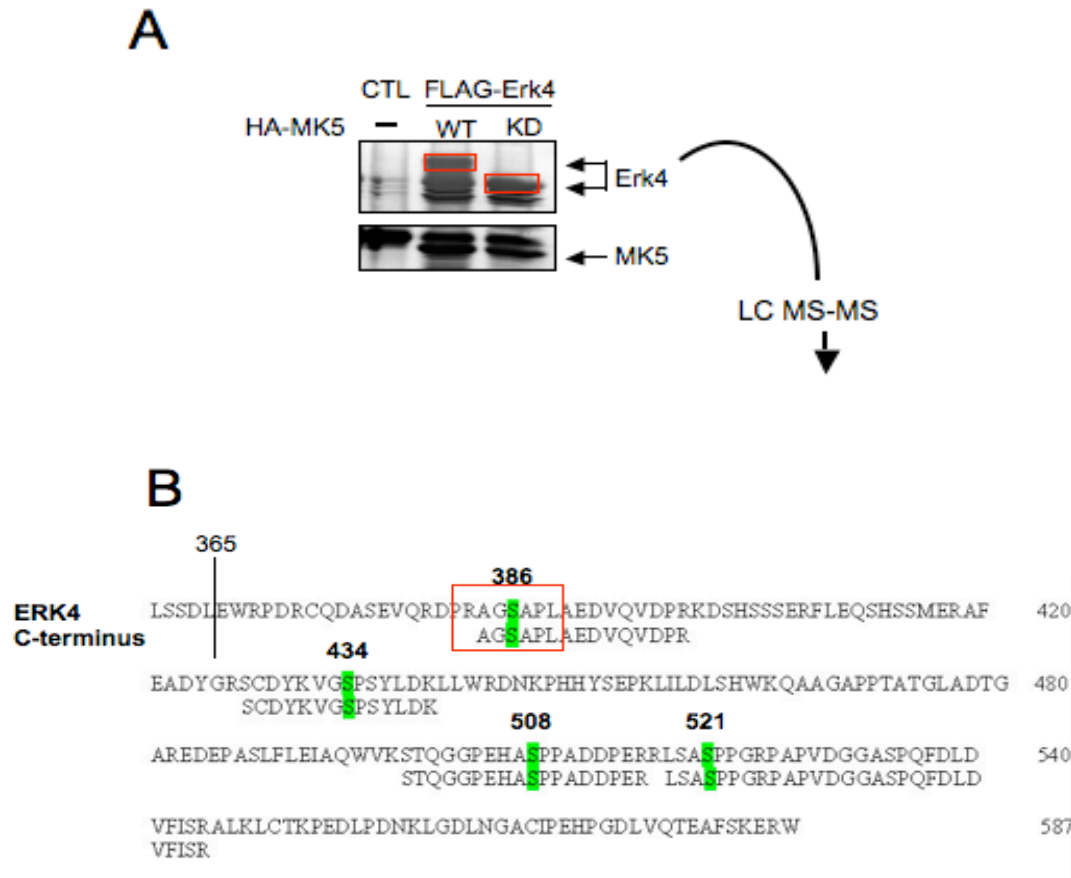


FIG. 14. L'extrémité C-terminale de Erk4 est phosphorylée sur quatre résidus sérine *in vivo*.

A) Les cellules HEK 293 ont été transfectées avec FLAG-Erk4 et MK5 (WT) ou un mutant catalytiquement inactif de MK5 (KD). Les protéines ont été séparées sur gel de polyacrylamide dénaturant puis détectées par coloration d'argent. Brièvement, FLAG-Erk4 a été extraite du gel avant d'être soumis à une digestion tryptique. Les différents peptides ont été séparés par chromatographie liquide (LC) couplée à une spectrométrie de masse (MS) en tandem. B) Alignement des différents phospho-peptides identifiés par spectrométrie de masse sur la séquence de l'extrémité C-terminale de Erk4. Quatre résidus sérine ont été identifiés (vert). De ces résidus, la sérine 386 (encadré rouge) se retrouve dans une séquence consensus de phosphorylation s'apparentant à celle pour MK5 (Hyd-X-R-X-L-pS/T).

4.4 Caractérisation de la fonction physiologique de Erk4

4.4.1 L'inactivation du gène *Mapk4* murin ne révèle aucun phénotype apparent

Erk4 a été identifiée en 1994 (18). Depuis, cette MAP kinase a été très peu caractérisée et aucune fonction ne lui a été attribuée. Nous avons inactivé le gène *Mapk4* chez la souris afin d'étudier les phénotypes associés à la perte de Erk4 et ainsi, caractériser la fonction physiologique de Erk4.

L'inactivation du gène *Mapk4* murin n'entraîne aucun phénotype apparent dans des conditions physiologiques. Les souris Erk4-déficientes sont viables, fertiles et sont présentes dans une proportion Mendélienne. De plus, l'analyse histo-pathologique n'a révélé aucun défaut structural apparent.

MK5 est le seul substrat de Erk4 identifié jusqu'à maintenant. Bien que la fonction précise de MK5 ne soit pas encore connue, certaines données récentes suggèrent que MK5 est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire (16, 31, 54). Par exemple le groupe de C.O. Joe a montré que la surexpression de MK5 est suffisante pour induire la migration cellulaire et que cet effet est dépendant de la phosphorylation de la boucle d'activation de MK5 (54). Il serait intéressant d'adresser le rôle de Erk4 dans la migration cellulaire. Ceci pourrait être fait par exemple en comparant l'index de migration des MEFs Erk4^{+/+} et Erk4^{-/-}.

MK5 semble également jouer un rôle dans la suppression de tumeurs (52). Les souris MK5-déficientes traitées au DMBA développent des tumeurs de la peau plus précocement et ont un taux de survie beaucoup moins élevé que les souris de type sauvage (52). De plus, le groupe de Han a montré que MK5 est requise pour la sénescence induite par HA-Ras^{V12} dans les fibroblastes murins et humains et que la perte de MK5 facilite la transformation de ces cellules (52). Le rôle de Erk4 dans la tumorigénèse est présentement à l'étude dans notre laboratoire. La susceptibilité des souris Erk4-déficientes à développer des tumeurs pulmonaires induites par l'uréthane est en cours.

4.4.2 Erk4 et Erk3 exercent des fonctions non-redondante *in vivo*

Le degré élevé d'homologie entre Erk4 et Erk3 au niveau de la structure de la protéine et de l'organisation du gène suggère fortement que les gènes *Mapk4* et *Mapk6* sont des paralogues (10, 56). La redondance génétique entre gènes paralogues est l'une des raisons pour laquelle l'inactivation génique n'entraîne aucun phénotype. Ainsi, dû à un mécanisme de compensation, l'inactivation de certains gènes ne permet pas de révéler certaines fonctions protéiques. Par exemple, chez les MAP kinases, le rôle de Jnk1 et de Jnk2 dans le développement du tube neural n'a été établi que lorsque les deux gènes ont été inactivés simultanément chez la souris (33, 45).

L'inactivation du gène *MyoD* et *Myf5* impliqués dans la myogénèse est un autre exemple de redondance génétique entre deux paralogues. En effet, l'inactivation de l'un ou l'autre de ces gènes n'a pas d'impact sur le développement musculaire (5, 43), alors que l'inactivation des deux gènes entraîne une absence complète des muscles squelettiques (44). Chez les souris *MyoD*-déficientes, l'absence de MyoD entraîne une augmentation des niveaux d'expression de *Myf5* dans les muscles squelettiques, ce qui pourrait expliquer pourquoi ces souris ne présentent aucune anomalie musculaire (43). Nous avons regardé si ce mécanisme de compensation pouvait expliquer l'absence de phénotype des souris *Erk4*^{-/-}. Notre analyse des profils d'expression de Erk3 au cours du développement embryonnaire et dans les tissus adultes indique que l'expression de Erk3 ne compense pas pour la perte de Erk4.

Dans notre laboratoire, Benjamin Turgeon a inactivé le gène *Mapk6* murin. Contrairement aux souris *Erk4*^{-/-}, les souris *Erk3*^{-/-} meurent dans les premières 24 heures suivant la naissance et près de 40% de ces souris présentent une détresse respiratoire sévère entraînant la mort au cours des 30 premières minutes. La caractérisation du phénotype engendré par l'inactivation de Erk3 a révélé que ces animaux présentent un retard de croissance intra-utérin prononcé ainsi qu'un défaut de maturation pulmonaire (29). La différence de phénotype entre les souris *Erk4*^{-/-} et *Erk3*^{-/-} suggère que ces deux paralogues possèdent des fonctions spécifiques *in vivo*. Afin d'adresser la question de la redondance fonctionnelle entre Erk4 et Erk3, nous avons regardé si l'inactivation de Erk4 avait un impact sur la croissance intra-utérine et sur la maturation des poumons. Nos résultats indiquent que l'absence de Erk4 n'entraîne aucun des phénotypes associés à la perte de Erk3.

Dû à des mécanismes complexes de compensation, il arrive parfois que l'inactivation de gènes paralogues ayant conservé des fonctions redondantes engendre des phénotypes différents. Par exemple, les souris *Erk1*^{-/-} ne présentent aucun défaut de développement (42), alors que l'inactivation conditionnelle de Erk2 dans la crête neurale entraîne une malformation crânio-faciale et conotruncale (39). Ceci suggère donc que Erk1 et Erk2 exercent des fonctions non-redondantes *in vivo*. Cependant, l'inactivation additionnelle de Erk1 a révélé que les défauts observés chez les souris *Erk2* conditionnelles sont accentués de manière dose-dépendante par la perte de Erk1 (39). Ainsi, la différence

de phénotype entre les souris Erk1^{-/-} et les souris Erk2^{-/-} conditionnelles est plutôt due à un mécanisme de compensation assuré par Erk2 que parce que Erk2 exerce des fonctions spécifiques dans le développement de la crête neurale. Afin de démontrer que Erk3 et Erk4 ont des fonctions non-redondantes *in vivo*, nous avons regardé si l'inactivation additionnelle de Erk4 pouvait accentuer le phénotype des souris Erk3-déficientes. L'analyse des souris Erk3/Erk4-nulles a révélé que l'absence de Erk4 n'aggrave pas le retard de croissance intra-utérin et le défaut de maturation des poumons résultant de l'inactivation de Erk3. De plus, le fait que l'inactivation des deux allèles de Erk4 et d'un allèle de Erk3 ne cause pas de létalité embryonnaire indique que le phénotype de létalité des souris doubles mutantes est uniquement attribuable à la perte de Erk3. Mis ensemble, ces résultats viennent renforcer l'idée que Erk3 possède des fonctions spécifiques par rapport à Erk4. Cependant, ceux-ci n'excluent pas que dans certaines conditions, Erk4 et Erk3 aient des fonctions physiologiques redondantes. En effet, bien que l'impact fonctionnel de l'interaction entre Erk3/Erk4 et MK5 ne soit pas connu, ces deux kinases ont en commun d'activer et de relocaliser MK5 (3, 27, 47, 49).

Les gènes paralogues sont des gènes qui ont évolué suite à la duplication d'un gène ancestral commun (30). Bien que les gènes paralogues puissent conserver des fonctions redondantes, la duplication d'un gène est considérée comme un événement majeur conduisant à la diversification génique. Après la duplication, les gènes paralogues vont traverser une période de sélection naturelle permissive durant laquelle les deux gènes vont subir différentes mutations (9, 14, 19, 40). Éventuellement, les caractéristiques des deux gènes vont diverger, ce qui va entraîner l'acquisition de fonctions physiologiques spécifiques à chacun.

Quelques modèles ont été proposés pour expliquer la diversification des gènes, dont la sub-fonctionnalisation. Par définition, la sub-fonctionnalisation est le partage des fonctions d'un gène ancestral entre deux gènes paralogues (14). Ce partage peut se faire au niveau de la fonction du gène, mais également au niveau du profil d'expression du gène ancestral (14, 19). Ainsi, deux gènes paralogues peuvent avoir des fonctions physiologiques spécifiques découlant du fait qu'ils présentent des profils d'expression spatio-temporels différents. L'analyse du profil d'expression de Erk3 et Erk4 dans les tissus adultes murins indique que Erk4 est principalement exprimée dans le cerveau, alors que l'expression de

Erk3 est ubiquitaire. Cette distinction pourrait ainsi expliquer que ces deux paralogues peuvent avoir des fonctions physiologiques différentes.

La diversification fonctionnelle des gènes paralogues, due à une néofonctionnalisation (nouvelle fonction) et/ou à une sub-fonctionnalisation est généralement considérée comme étant le résultat d'une divergence symétrique qui affecte de manière équivalente les deux gènes. Cependant, certaines évidences laissent suggérer que les gènes paralogues peuvent diverger de manière asymétrique suite à la duplication. En analysant conjointement des données génétiques et biochimiques obtenues chez la levure, A. Wagner a constaté que l'un des gènes paralogues acquiert souvent des interactions protéines-protéines et un mécanisme de régulation plus complexe (58). Ainsi, les gènes paralogues pourraient avoir des fonctions spécifiques parce qu'ils ont divergé de manière asymétrique. De manière intéressante, malgré la grande similitude entre Erk4 et Erk3, ces deux kinases présentent également des différences importantes au niveau de leur structure et de leur régulation. Premièrement, bien que Erk4 et Erk3 partagent 73% d'identité protéique au niveau du domaine kinase, le degré d'homologie au niveau de l'extension C-terminale n'est que de 31%. Erk3 possède d'ailleurs 137 acides aminés additionnels par rapport à Erk4. Deuxièmement, Erk4 est une protéine stable alors que Erk3 est instable dû à sa dégradation constitutive par le système ubiquitine-protéasome (3, 11, 27). Troisièmement, Erk4 et Erk3 présentent une localisation sub-cellulaire distincte dans plusieurs types cellulaires différents (3, 25).

L'inactivation de gène *Mapk4* a permis de révéler que contrairement à son paralogue Erk3, Erk4 n'est pas essentielle au développement murin dans des conditions physiologiques. De plus, nos résultats suggèrent fortement que la différence de phénotype entre les souris Erk4- et Erk3-déficientes n'est pas due à mécanisme de compensation assuré par Erk3. Finalement, notre étude a permis de montrer que Erk4 et Erk3 ont du moins certaines fonctions physiologiques non-redondantes *in vivo*.

4.4.3 Erk4 pourrait avoir un rôle à jouer dans les comportements associés aux troubles de l'humeur

Puisque le cerveau est l'organe où l'expression de Erk4 est la plus forte, nous avons, en collaboration avec le laboratoire du Dr. Nicolas Cermakian, analysé l'impact de

l'inactivation de Erk4 sur le comportement des souris. De manière intéressante, le groupe de U. Moens a montré que les souris transgéniques exprimant une forme constitutivement active de MK5 ont un comportement moins anxieux (17). Ainsi, aux niveaux physiologiques, il est possible que dans certaines conditions de stress, l'activation de MK5 permette d'atténuer la réponse cellulaire conduisant à des comportements de type anxieux et que cette activation soit dépendante de Erk4.

Nous avons donc dans un premier temps soumis les souris Erk4-nulles aux tests du "Elevated plus maze" et Thatcher-Britten afin de mesurer les comportements de type anxieux. Les souris ont une aversion des espaces ouverts et ont plutôt tendance à éviter de s'y retrouver. Les deux tests sont basés sur cette aversion. Le premier test se fait sur une plateforme surélevée en forme de croix constituée de deux bras fermés et deux bras ouverts. Le temps que passent les souris dans les bras ouverts est enregistré. Une augmentation du temps passé dans cette zone indique que les souris présentent une diminution des comportements de type anxieux. Pour le deuxième test, les souris sont privées de nourriture pendant 24h puis placées sur une grande plateforme sur laquelle, en plein milieu, a été déposé de la nourriture. La souris est alors confrontée entre l'aversion des espaces ouverts et le besoin de se nourrir. Le temps que prends la souris à décider d'aller se nourrir est alors mesuré. Une diminution du temps que prend la souris à faire son choix est un indicatif d'une diminution des comportements de type anxieux. Lors de ces deux tests, les résultats obtenus indiquent que les souris Erk4^{-/-} ont une tendance à avoir moins de comportements de type anxieux (FIG. 15.). Cependant, la différence observée entre les souris Erk4^{-/-} et les souris contrôles n'est pas significative. Considérant la possibilité que l'activité de MK5 puisse atténuer les comportements de type anxieux et que cette activation puisse être dépendante de Erk4, on se serait attendu à ce que les souris Erk4^{-/-} présentent davantage de comportements de type anxieux. Bien que nos résultats ne soient concluants, les souris Erk4 ont tendance à avoir un comportement inverse.

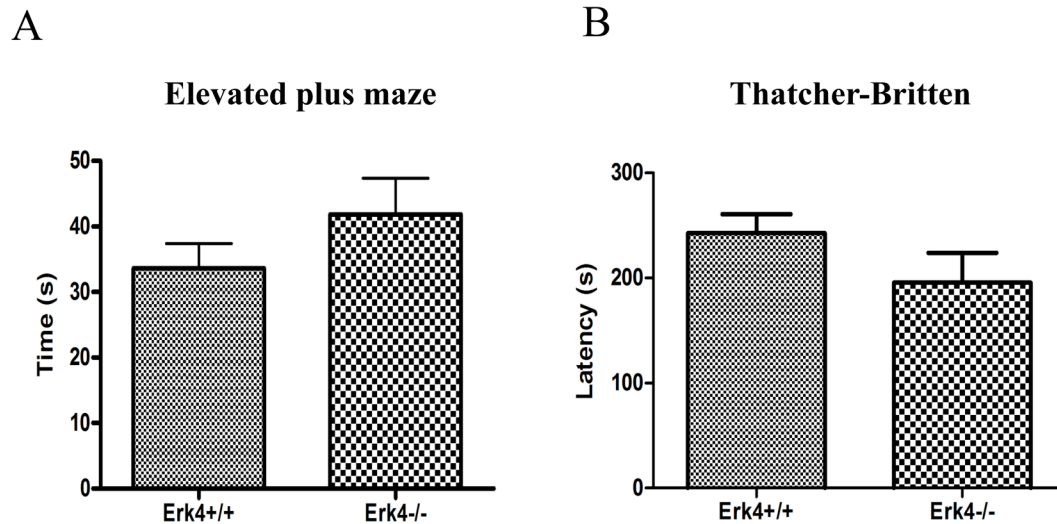


FIG. 15. Résultats des tests de comportements de type anxieux chez les souris Erk4^{-/-}.

A) Elevated plus maze. Représentation du temps passé dans les bras ouverts. B) Thatcher-Britten. Représentation du temps que prend la souris (latence) avant de surmonter son aversion des l'espaces ouverts et d'aller se nourrir. s(seconde). Une cohorte de 5 animaux par génotype a été utilisée pour les deux tests.

Dans un deuxième temps, les souris Erk4^{-/-} ont été soumises au test de la nage forcée. Ce test consiste à mettre les souris dans un bocal d'eau pendant 6 minutes et à mesurer pendant les 4 dernières minutes le temps d'immobilité. Cette mesure représente la résignation des souris face à un stress, ce qui est un indicatif d'une augmentation des comportements de type dépressif. Lors de ce test, le temps d'immobilité des souris Erk4^{-/-} par rapport aux souris contrôles est significativement plus élevé (FIG. 16.), suggérant que les souris Erk4^{-/-} présentent une augmentation des comportements de type dépressif.

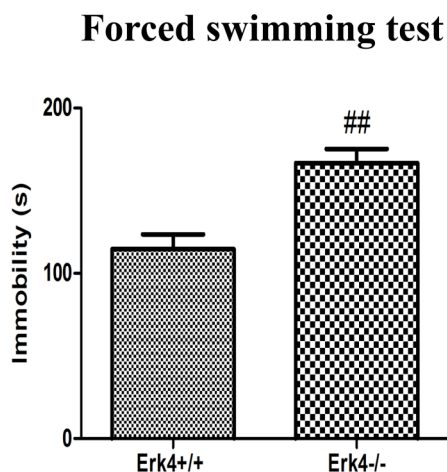


FIG. 16. Les souris Erk4^{-/-} présentent une augmentation des comportements de type dépressif.

Test de la nage forcée. Le temps d'immobilité des souris est mesuré pendant 4 minutes. Une cohorte de 5 animaux par génotype a été utilisée. s(seconde). $p < 0.01$.

Ce résultat est fort intéressant et méritera qu'on s'y attarde davantage. La sérotonine joue un rôle majeur dans le contrôle des comportements associés aux troubles de l'humeur, mais également dans les fonctions cardio-vasculaires et le contrôle de la respiration (21, 24, 34). Il serait donc très judicieux de mesurer les niveaux de sérotonine chez les souris Erk4^{-/-}. De plus, il serait intéressant de regarder si Erk4 est exprimée dans certains neurones du noyau de Raphé situé dans le tronc cérébral. Ces neurones sont impliqués dans la synthèse et la sécrétion de la sérotonine au niveau du système nerveux central (22, 24). Considérant que la sérotonine joue également un rôle dans le contrôle de la respiration, il est d'autant plus pertinent de pousser cette étude puisque Erk3 est également exprimé dans le cerveau et que les souris Erk3-nulles présentent une détresse respiratoire marquée qui ne dépend pas seulement d'un problème de maturation du poumon (29).

Il est important pour valider ces résultats de s'assurer que les souris ne présentent pas de problèmes au niveau de l'activité locomotrice et de la coordination motrice. Les résultats de ces tests n'ont révélé aucune anomalie à ce niveau chez les souris Erk4^{-/-}.

4.4.4 Les souris Erk4^{-/-} : un modèle expérimental d'une grande valeur

Les modèles animaux sont des outils précieux pour étudier les mécanismes impliqués dans plusieurs pathologies comme le cancer (15, 59), les maladies neuro-

dégénératives (35, 50), l'obésité et le diabète (38, 51). Le rôle de Erk4 dans plusieurs pathologies pourrait être adressé à l'aide de notre modèle animal.

Les souris Erk4^{-/-} pourraient par exemple être soumises à une diète riche en gras afin de déterminer si elles sont sujettes à devenir obèses et à développer une résistance à l'insuline. Plusieurs approches différentes peuvent être utilisées afin d'évaluer l'homéostasie du glucose *in vivo* (20). Ainsi, la résistance à l'insuline pourrait également être évaluée en mesurant les niveaux de glucose sanguin à différents temps suite à une injection de glucose dans la cavité intra-péritonéale des souris.

Les souris Erk4^{-/-} pourraient également être intercroisées avec des souris transgéniques utilisées comme modèle d'étude de la tumorigénèse (15) afin d'évaluer le rôle de Erk4 dans le développement des tumeurs. Par exemple, les souris Erk4-nulles pourraient être intercroisées avec des souris dont l'expression conditionnelle dans le poumon de l'oncogène K-Ras (G12D) induit la formation d'adénocarcinomes (23). L'injection locale d'un vecteur rétroviral pourrait également être utilisé pour évaluer l'impact de la délétion de Erk4 sur le développement tumoral. Par exemple, l'injection d'un vecteur rétroviral codant pour une forme recombinante du PDGF permet d'induire des glioblastomes (57). De plus, considérant le rôle de MK5 dans la suppression de tumeur (52), il serait intéressant de générer des souris Erk4^{-/-};MK5^{-/-} afin de mesurer la susceptibilité de ces souris à développer des tumeurs induites par des agents carcinogènes. Parallèlement, les MEFs isolées des souris Erk4^{-/-} pourraient être utilisées afin d'évaluer la sénescence et la transformation induite par des oncogènes.

Considérant que Erk4 est exprimée dans le cœur, il serait également intéressant d'évaluer l'implication de Erk4 dans l'hypertrophie et le remodelage du ventricule gauche. Lors d'un infarctus du myocarde, le remodelage du ventricule gauche est un mécanisme de compensation qui permet de maintenir les fonctions cardiaques (53). Cependant, lorsque ce remodelage est trop important, il conduit éventuellement au dysfonctionnement du ventricule et peut provoquer un arrêt cardiaque (41). Sur un modèle animal, l'infarctus du myocarde peut être provoqué par une procédure chirurgicale, l'occlusion de l'artère coronarienne descendante gauche (LAD), afin de générer une ischémie transitoire (37).

Cette technique pourrait être utilisée pour investiguer les fonctions de Erk4 dans les mécanismes d'adaptation et/ou de détérioration suite à un infarctus du myocarde.

4.5 L'inactivation de l'activité kinase de Erk3 chez la souris révèle que Erk3 possède des fonctions qui sont indépendantes de son activité kinase.

Durant mes études doctorales, nous avons également généré des souris Erk3 dépourvues d'activité catalytique (FIG. 17.). Lorsque nous avons entamé ce projet, nous voulions savoir si l'activité kinase de Erk3 était importante pour sa fonction. À l'époque, aucun substrat de Erk3 et Erk4 n'avait été identifié. De plus, nous avions des données qui suggéraient que l'effet négatif de Erk3 sur la prolifération ne dépendait pas de l'activité kinase mais plutôt de l'extension C-terminale de Erk3 (11, 25). Cette étude est devenue d'autant plus pertinente lorsque récemment, il a été montré que Erk3 pouvait également activer MK5, le seul substrat de Erk3/4 identifié à ce jour, de manière kinase-indépendante (47).

Afin de générer des souris exprimant une forme de Erk3 sans activité kinase (Erk3KA), nous avons muté par recombinaison homologe la région du gène *Mapk6* codant pour les deux résidus lysines nécessaires à la liaison de l'ATP (FIG. 17. A et B). Nous avons identifié deux clones ES (Embryonic stem cell) (41-K3KA, 62-K3KA) dont la mutation a été insérée correctement au locus *Mapk6* (FIG. 17. C et D). Le clone 62-K3KA a été utilisé afin de générer les souris hétérozygotes Erk3KA. Ces souris ont été intercroisées afin d'obtenir des souris homozygotes Erk3KA. Le génotypage des souris issues de ces inter-croisements a révélé la présence de souris homozygotes Erk3KA (FIG. 17. E).

Contrairement à l'inactivation complète de Erk3 (29), l'inactivation de l'activité kinase de Erk3 n'engendre pas la mort néo-natale des souriceaux démontrant ainsi que l'activité catalytique de Erk3 n'est pas essentielle pour le développement murin et par le fait même que Erk3 possède des fonctions kinase-indépendantes *in vivo*. Quelques évidences laissent suggérer que certaines MAP kinases ont également des fonctions indépendantes de leur activité kinase. Par exemple, le groupe de M. R. Rosner a montré que l'expression ectopique de Erk7 inhibe la prolifération cellulaire et que cet effet est indépendant de l'activité kinase (2). p38 pourrait également avoir certaines fonctions kinase-indépendantes. En effet, le groupe de X. Ye a montré que la déplétion de p38 par

siRNA inhibe la prolifération cellulaire et que l'expression d'un mutant catalytiquement inactif peut renverser cette inhibition (13)

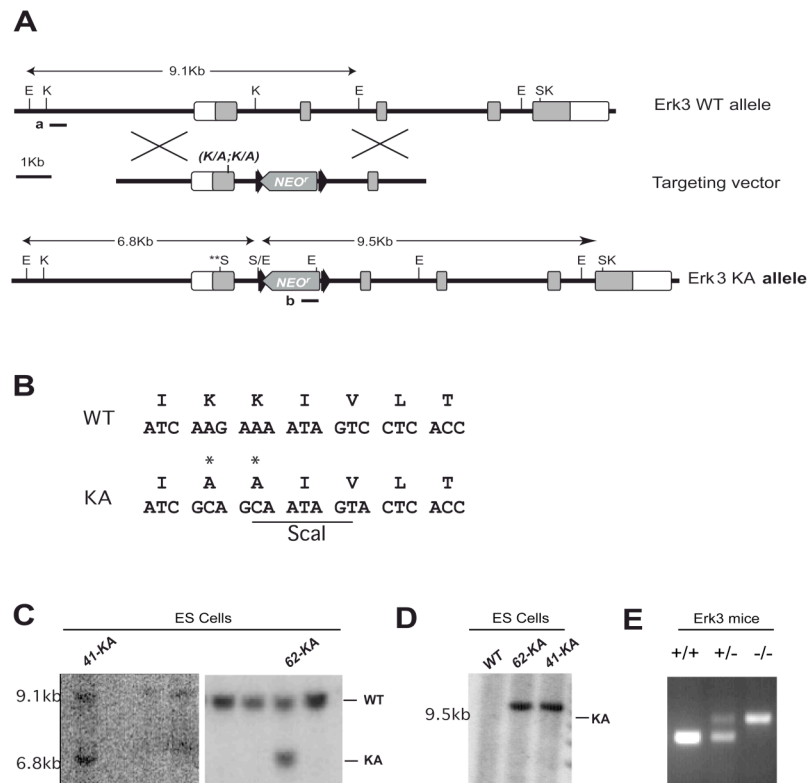


FIG. 17. Génération des souris exprimant une forme catalytiquement inactive de Erk3.

A) Représentation schématique du locus *Mapk6* comprenant les exons 2 à 6. Le vecteur de ciblage comprend l'exon 2 contenant la mutation de la région codant pour les deux résidus lysines nécessaires à la liaison de l'ATP (K/A;K/A) ainsi qu'un gène de résistance à la néomycine afin de sélectionner les clones ES qui ont intégré le vecteur de ciblage par recombinaison homologue. Afin de vérifier que le vecteur a été inséré correctement au locus *Mapk6*, un site de digestion EcoRI et Scal a également été ajouté. B) Représentation de la séquence nucléotidique et protéique de l'allèle WT et KA. Les nucléotides codants pour la Lys⁴⁹ et la Lys⁵⁰ (KK) ont été mutés afin de générer des résidus alanines (AA). C) Identification des clones ES dont la mutation a été intégrée correctement au locus *Mapk6* en 5'. La présence de l'allèle WT (9.1Kb) et KA (6.8kb) suite à une digestion EcoRI a été confirmée par Southern-Blot à l'aide d'une sonde dérivée de la séquence génomique en 5' de l'exon 2 (sonde a). D) Identification des clones ES dont la mutation a été intégrée correctement au locus *Mapk6* en 3'. La présence de l'allèle KA (9.5Kb) suite à une digestion Scal a été confirmée par Southern-Blot à l'aide de la sonde dérivée de la séquence du gène de la néomycine (sonde b). E) Analyse du génotype des souris issues de l'inter-croisement des souris hétérozygotes Erk3KA. La présence des différents génotypes a été confirmée par PCR.

Les souris Erk3KA ont maintenant atteint l'âge adulte. Jusqu'à présent, ces souris ne présentent aucun phénotype apparent. L'analyse plus détaillée du phénotype des souris Erk3KA est présentement en cours.

CONCLUSION

Beaucoup d'efforts ont été consacrés afin de caractériser la fonction de la MAP kinase atypique Erk4. Nous avons abordé la question en utilisant deux approches, soit une approche biochimique et une approche génétique. Nos travaux ont permis de confirmer que la boucle d'activation de cette MAP kinase atypique est phosphorylée *in vivo* et que cette phosphorylation est importante pour l'activité kinase de Erk4. La caractérisation du mécanisme d'activation de Erk4 a permis de révéler que cette kinase échappe au mode de régulation conventionnel s'appliquant aux MAP kinases classiques. Nos résultats suggèrent également que la phosphorylation de la boucle d'activation de Erk4 est modulable et qu'il existe une "Erk3/4 kinase" dont le recrutement et/ou l'activation sont facilités par MK5. De plus, nous avons identifié quatre nouveaux sites de phosphorylation sur Erk4 *in vivo* soit les sérines 386, 434, 508 et 521.

L'inactivation du gène *Mapk4* chez la souris n'a révélé aucun phénotype apparent dans des conditions physiologiques. Cependant, lorsque ces souris ont été confrontées à des situations stressantes, les tests de comportement ont permis de révéler que ces souris présentent une augmentation des comportements de type dépressif. De plus, ce modèle nous a permis d'adresser la question de la redondance fonctionnelle entre Erk4 et Erk3. Notre étude a ainsi permis de révéler que Erk3 exerce des fonctions spécifiques *in vivo* et que ces fonctions ne sont pas redondantes avec celles de Erk4. Bien qu'il reste beaucoup à faire afin d'identifier la fonction de Erk4, nos travaux ont permis de caractériser davantage cette MAP kinase atypique et de générer un modèle animal qui pourra servir pour la suite de cette quête...

Parallèlement, nous avons généré des souris Erk3 dépourvues d'activité catalytique, ce qui nous a permis de montrer que l'activité kinase de Erk3 n'est pas essentielle pour le développement murin et par le fait même, que Erk3 possède des fonctions *in vivo* qui ne dépendent pas de son activité kinase.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abe, M. K., K. T. Kahle, M. P. Saelzler, K. Orth, J. E. Dixon, and M. R. Rosner.** 2001. ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J Biol Chem* **276**:21272-9.
2. **Abe, M. K., W. L. Kuo, M. B. Hershenson, and M. R. Rosner.** 1999. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol* **19**:1301-12.
3. **Aberg, E., M. Perander, B. Johansen, C. Julien, S. Meloche, S. M. Keyse, and O. M. Seternes.** 2006. Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* **281**:35499-510.
4. **Aberg, E., K. M. Torgersen, B. Johansen, S. M. Keyse, M. Perander, and O. M. Seternes.** 2009. Docking of PRAK/MK5 to the atypical MAPKs ERK3 and ERK4 defines a novel MAPK interaction motif. *J Biol Chem* **284**:19392-401.
5. **Braun, T., M. A. Rudnicki, H. H. Arnold, and R. Jaenisch.** 1992. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* **71**:369-82.
6. **Canagarajah, B. J., A. Khokhlatchev, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**:859-69.
7. **Cheng, M., T. G. Boulton, and M. H. Cobb.** 1996. ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem* **271**:8951-8.
8. **Cheng, M., E. Zhen, M. J. Robinson, D. Ebert, E. Goldsmith, and M. H. Cobb.** 1996. Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3. *J Biol Chem* **271**:12057-62.
9. **Conant, G. C., and K. H. Wolfe.** 2008. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat Rev Genet* **9**:938-50.
10. **Coulombe, P., and S. Meloche.** 2007. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**:1376-87.
11. **Coulombe, P., G. Rodier, S. Pelletier, J. Pellerin, and S. Meloche.** 2003. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* **23**:4542-58.
12. **Dummler, B. A., C. Hauge, J. Silber, H. G. Yntema, L. S. Kruse, B. Kofoed, B. A. Hemmings, D. R. Alessi, and M. Frodin.** 2005. Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types. *J Biol Chem* **280**:13304-14.
13. **Fan, L., X. Yang, J. Du, M. Marshall, K. Blanchard, and X. Ye.** 2005. A novel role of p38 alpha MAPK in mitotic progression independent of its kinase activity. *Cell Cycle* **4**:1616-24.
14. **Force, A., M. Lynch, F. B. Pickett, A. Amores, Y. L. Yan, and J. Postlethwait.** 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**:1531-45.
15. **Frese, K. K., and D. A. Tuveson.** 2007. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* **7**:645-58.

16. **Gerits, N., T. Mikalsen, S. Kostenko, A. Shiryaev, M. Johannessen, and U. Moens.** 2007. Modulation of F-actin rearrangement by the cyclic AMP/cAMP-dependent protein kinase (PKA) pathway is mediated by MAPK-activated protein kinase 5 and requires PKA-induced nuclear export of MK5. *J Biol Chem* **282**:37232-43.
17. **Gerits, N., W. Van Belle, and U. Moens.** 2007. Transgenic mice expressing constitutive active MAPKAPK5 display gender-dependent differences in exploration and activity. *Behav Brain Funct* **3**:58.
18. **Gonzalez, F. A., D. L. Raden, M. R. Rigby, and R. J. Davis.** 1992. Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett* **304**:170-8.
19. **Hahn, M. W.** 2009. Distinguishing among evolutionary models for the maintenance of gene duplicates. *J Hered* **100**:605-17.
20. **Heikkinen, S., C. A. Argmann, M. F. Champy, and J. Auwerx.** 2007. Evaluation of glucose homeostasis. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 29**:Unit 29B 3.
21. **Hodges, M. R., and G. B. Richerson.** 2008. Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: neuromodulatory and trophic effects. *Respir Physiol Neurobiol* **164**:222-32.
22. **Hornung, J. P.** 2003. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat* **26**:331-43.
23. **Jackson, E. L., N. Willis, K. Mercer, R. T. Bronson, D. Crowley, R. Montoya, T. Jacks, and D. A. Tuveson.** 2001. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* **15**:3243-8.
24. **Jonnakuty, C., and C. Gragnoli.** 2008. What do we know about serotonin? *J Cell Physiol* **217**:301-6.
25. **Julien, C., P. Coulombe, and S. Meloche.** 2003. Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J Biol Chem* **278**:42615-24.
26. **Kaldis, P.** 1999. The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci* **55**:284-96.
27. **Kant, S., S. Schumacher, M. K. Singh, A. Kispert, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2006. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem* **281**:35511-9.
28. **Khokhlatchev, A. V., B. Canagarajah, J. Wilsbacher, M. Robinson, M. Atkinson, E. Goldsmith, and M. H. Cobb.** 1998. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**:605-15.
29. **Klinger, S., B. Turgeon, K. Levesque, G. A. Wood, K. M. Aagaard-Tillery, and S. Meloche.** 2009. Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:16710-5.
30. **Koonin, E. V.** 2005. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu Rev Genet* **39**:309-38.
31. **Kostenko, S., M. Johannessen, and U. Moens.** 2009. PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cell Signal* **21**:712-8.

32. **Kotlyarov, A., Y. Yannoni, S. Fritz, K. Laass, J. B. Telliez, D. Pitman, L. L. Lin, and M. Gaestel.** 2002. Distinct cellular functions of MK2. *Mol Cell Biol* **22**:4827-35.
33. **Kuan, C. Y., D. D. Yang, D. R. Samanta Roy, R. J. Davis, P. Rakic, and R. A. Flavell.** 1999. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* **22**:667-76.
34. **Lucki, I.** 1998. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* **44**:151-62.
35. **McGowan, E., J. Eriksen, and M. Hutton.** 2006. A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet* **22**:281-9.
36. **Meggio, F., and L. A. Pinna.** 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* **17**:349-68.
37. **Michael, L. H., M. L. Entman, C. J. Hartley, K. A. Youker, J. Zhu, S. R. Hall, H. K. Hawkins, K. Berens, and C. M. Ballantyne.** 1995. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* **269**:H2147-54.
38. **Nandi, A., Y. Kitamura, C. R. Kahn, and D. Accili.** 2004. Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* **84**:623-47.
39. **Newbern, J., J. Zhong, R. S. Wickramasinghe, X. Li, Y. Wu, I. Samuels, N. Cherosky, J. C. Karlo, B. O'Loughlin, J. Wikenheiser, M. Gargesha, Y. Q. Doughman, J. Charron, D. D. Ginty, M. Watanabe, S. C. Saitta, W. D. Snider, and G. E. Landreth.** 2008. Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:17115-20.
40. **Ohno, S.** 1970. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag-Berlin.
41. **Opie, L. H., P. J. Commerford, B. J. Geresh, and M. A. Pfeffer.** 2006. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* **367**:356-67.
42. **Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger, and J. Pouyssegur.** 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* **286**:1374-7.
43. **Rudnicki, M. A., T. Braun, S. Hinuma, and R. Jaenisch.** 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**:383-90.
44. **Rudnicki, M. A., P. N. Schnegelsberg, R. H. Stead, T. Braun, H. H. Arnold, and R. Jaenisch.** 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**:1351-9.
45. **Sabapathy, K., W. Jochum, K. Hochedlinger, L. Chang, M. Karin, and E. F. Wagner.** 1999. Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* **89**:115-24.
46. **Salvador, J. M., P. R. Mittelstadt, T. Guszczynski, T. D. Copeland, H. Yamaguchi, E. Appella, A. J. Fornace, Jr., and J. D. Ashwell.** 2005. Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol* **6**:390-5.
47. **Schumacher, S., K. Laass, S. Kant, Y. Shi, A. Visel, A. D. Gruber, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2004. Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *EMBO J* **23**:4770-9.
48. **Seternes, O. M., B. Johansen, B. Hegge, M. Johannessen, S. M. Keyse, and U. Moens.** 2002. Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress. *Mol Cell Biol* **22**:6931-45.

49. **Seternes, O. M., T. Mikalsen, B. Johansen, E. Michaelsen, C. G. Armstrong, N. A. Morrice, B. Turgeon, S. Meloche, U. Moens, and S. M. Keyse.** 2004. Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *EMBO J* **23**:4780-91.
50. **Shimohama, S., H. Sawada, Y. Kitamura, and T. Taniguchi.** 2003. Disease model: Parkinson's disease. *Trends Mol Med* **9**:360-5.
51. **Speakman, J., C. Hambly, S. Mitchell, and E. Krol.** 2008. The contribution of animal models to the study of obesity. *Lab Anim* **42**:413-32.
52. **Sun, P., N. Yoshizuka, L. New, B. A. Moser, Y. Li, R. Liao, C. Xie, J. Chen, Q. Deng, M. Yamout, M. Q. Dong, C. G. Frangou, J. R. Yates, 3rd, P. E. Wright, and J. Han.** 2007. PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* **128**:295-308.
53. **Sutton, M. G., and N. Sharpe.** 2000. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* **101**:2981-8.
54. **Tak, H., E. Jang, S. B. Kim, J. Park, J. Suk, Y. S. Yoon, J. K. Ahn, J. H. Lee, and C. O. Joe.** 2007. 14-3-3epsilon inhibits MK5-mediated cell migration by disrupting F-actin polymerization. *Cell Signal* **19**:2379-87.
55. **Tassan, J. P., S. J. Schultz, J. Bartek, and E. A. Nigg.** 1994. Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol* **127**:467-78.
56. **Turgeon, B., B. F. Lang, and S. Meloche.** 2002. The protein kinase ERK3 is encoded by a single functional gene: genomic analysis of the ERK3 gene family. *Genomics* **80**:673-80.
57. **Uhrbom, L., G. Hesselager, M. Nister, and B. Westermarck.** 1998. Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus. *Cancer Res* **58**:5275-9.
58. **Wagner, A.** 2002. Asymmetric functional divergence of duplicate genes in yeast. *Mol Biol Evol* **19**:1760-8.
59. **Wu, X., and P. P. Pandolfi.** 2001. Mouse models for multistep tumorigenesis. *Trends Cell Biol* **11**:S2-9.

